
Untersuchung zur Bedeutung des Transkriptionsfaktors FoxM1 beim humanen Medulloblastom

Markus Priller



2013

Aus dem
Zentrum für Neuropathologie und Prionforschung
der Ludwig-Maximilians-Universität
Direktor: Prof. Dr. med. Dr. h. c. Hans Kretzschmar, FRCPath

Untersuchung zur Bedeutung des Transkriptionsfaktors FoxM1 beim humanen Medulloblastom

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Humanbiologie
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Markus Priller
aus Ingolstadt

Jahr
2013

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Dr. h. c. H. Kretzschmar, FRCPath

Mitberichterstatter: Prof. R. Glaß, PhD
Prof. Dr. B. Berninger
PD Dr. I. Schmid

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter: PD Dr. med. U. Schüller

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h. c. M. Reiser, FACR, FRCR

Tag der mündlichen Prüfung: 23.09.2013

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	ix
Summary	xi
1 Einleitung	12
1.1 Das Medulloblastom	12
1.1.1 Ursprung und Klassifikation	13
1.1.2 Symptome, Diagnostik und Therapie	16
1.1.3 Wichtige Signalwege beim Medulloblastom	17
1.1.4 Mausmodelle des Medulloblastoms	20
1.2 Die Familie der Forkhead-Box-Proteine	22
1.2.1 Der Transkriptionsfaktor FoxM1	22
1.2.2 Physiologische Bedeutung von FoxM1	23
1.2.3 Onkologische Bedeutung von FoxM1	24
1.3 Zielsetzung der Arbeit	25
2 Material und Methoden	26
2.1 Primersequenzen	26
2.2 Humane Proben	27
2.2.1 Eigene Kohorte	27
2.2.2 Microarraydaten humaner Medulloblastome	27
2.3 Arbeiten mit eukaryotischen Zellen	27
2.3.1 Humane Medulloblastomzelllinien	27
2.3.2 Transfektion	28
2.3.3 Produktion lentiviraler Partikel	28
2.3.4 Infektion mit Lentiviren	28
2.3.5 Bestimmung der Zellviabilität	28
2.3.6 Analyse des Spindelapparats	28
2.4 Molekularbiologische Methoden	29
2.4.1 Isolation von mRNA	29
2.4.2 Generierung von cDNA	29
2.4.3 Relative Quantifizierung mittels qRT-PCR	29
2.4.4 Isolation von Gesamtprotein aus Zellpellets	30

2.4.5	Bestimmung der Proteinkonzentration	30
2.4.6	SDS-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	30
2.4.7	Spezifischer Nachweis von Protein durch Western Blot	31
2.5	Histologische Methoden	32
2.5.1	Immunohistochemie	32
2.5.2	Immunofluoreszenzfärbung	32
2.6	Tierexperimentelle Arbeiten	32
2.6.1	Genotypisierung der verwendeten Mauslinien	33
2.6.1.1	Isolation genomischer DNA aus Mausschwanzbiopsien	33
2.6.1.2	Polymerasekettenreaktion (PCR) zum Nachweis des Genotyps	33
2.6.2	Primärzellkultur	34
2.6.3	Injektion von lentiviralen Partikeln	34
2.6.4	Subkutane Injektion von Tumorzellen	34
2.7	Statistische Analysen	35
3	Ergebnisse	36
3.1	Expressionsprofil von FoxM1 im humanen Medulloblastom	36
3.2	FoxM1 als prognostischer Marker	37
3.2.1	FoxM1 als histologischer prognostischer Marker	37
3.2.2	Multivariatenanalyse von Microarraydaten	39
3.3	Zelluläre Funktion von FoxM1	41
3.3.1	Expressionslevel von FoxM1 und Zusammenhang mit der Zellviabilität	41
3.3.2	FoxM1 und klinisch relevante Medikamente	42
3.3.3	Auswirkung des Knock-downs von FoxM1 auf die Ausbildung des Spindelapparats	44
3.3.4	Inhibierung von FoxM1 mit Siomycin A	46
3.3.5	Siomycin A bewirkt eine Fehlbildung des Spindelapparats	48
3.3.6	FoxM1 als mögliches Bindeglied zwischen Shh- und Wnt-Signalweg	50
3.4	<i>In vivo</i> -Experimente	54
3.4.1	Einfluss von FoxM1 auf das Überleben	54
3.4.2	Akuter Knock-out von FoxM1 in primären Medulloblastomkulturen	56
3.4.3	Injektion lentiviraler Partikel	58
3.4.4	Effekt von Siomycin A bei Xenograftmodellen	60
3.4.5	Interaktion von FoxM1 und Wnt	60
4	Diskussion	64
4.1	Bedeutung von FoxM1 als prognostischer Marker	64
4.2	Zelluläre Funktion von FoxM1	66
4.3	Bedeutung von FoxM1 für das Medulloblastom <i>in vivo</i>	67
4.4	Ausblick	70
A	Klinische Details der untersuchten Tumoren	72

Inhaltsverzeichnis	vi
<hr/>	
B Expression von FoxM1 in Bezug zur Histologie und Alter	74
Autorenindex	75
Literaturverzeichnis	79
Danksagung	103
Eidesstattliche Erklärung	107

Abbildungsverzeichnis

1.1	Klinisches Bild	13
1.2	Histologische Varianten des Medulloblastoms	14
1.3	Molekulare Klassifikation	16
1.4	Shh- und Wnt-Signalweg	19
1.5	FoxM1 - Gen- und Splicing-Varianten	23
3.1	Expressionsprofil von FoxM1 im humanen Medulloblastom	39
3.2	Einfluss der FoxM1-Expression auf das Überleben bei Medulloblastom . . .	40
3.3	Effekte des FoxM1-Knock-downs auf humane Medulloblastomzelllinien . . .	44
3.4	Überexpression von FoxM1 und Chemotherapeutika	45
3.5	Auswirkung des Knock-downs von FoxM1 auf die Ausbildung des Spindelapparats	48
3.6	Behandlung von humanen Medulloblastomzelllinien mit Siomycin A	50
3.7	Siomycin A bewirkt eine Fehlbildung des Spindelapparats	52
3.8	Inhibierung von FoxM1 aktiviert den Wnt-Signalweg	53
3.9	Einfluss von FoxM1 auf das Überleben	55
3.10	Akuter Verlust von FoxM1 vermindert die Proliferationsrate von Medulloblastomtumorzellen	58
3.11	Überleben nach Injektion lentiviraler Partikel	59
3.12	Tumorentwicklung nach Gabe von Siomycin A	61
3.13	Verlust von FoxM1 im murinen Medulloblastom führt zur Aktivierung des Wnt-Signalwegs	62
B.1	Expression von FoxM1 in Bezug zur Histologie und Alter	74

Tabellenverzeichnis

2.1	Sequenzen der verwendeten Primer.	26
2.2	PCR-Programm für die relative Quantifizierung	29
2.3	Zusammensetzung der SDS-Gele	31
2.4	Primer für die Genotypisierung	33
2.5	PCR-Programm für die Genotypisierung	33
3.1	Univariate Cox-Regression und multivariate Überlebensanalyse des Microarraydatensets.	41
A.1	Klinische Details humaner Medulloblastome	72

Zusammenfassung

Das Medulloblastom ist der häufigste maligne Gehirntumor bei Kindern. Derzeit überleben langfristig nur circa 60 - 70 % der betroffenen Kinder (Northcott et al., 2012). Daher ist die Entwicklung kausaler Therapiekonzepte Gegenstand intensiver Forschung.

In der vorliegenden Dissertation wurden zwei unabhängige Kohorten humaner Medulloblastome in Bezug auf die Expression von „Forkhead box M1“ (FoxM1) und dessen prognostische Bedeutung untersucht. Der Transkriptionsfaktor FoxM1 spielt eine Schlüsselrolle bei der Regulation des Zellzyklus und kann bei vielen verschiedenen Tumoren nachgewiesen werden. Überlebensanalysen konnten in beiden Kohorten zeigen, dass FoxM1 einen prognostischen Marker für das Medulloblastom darstellt. Dieser ist unabhängig von allen anderen erfassten klinischen Parametern (Metastasenstatus, Histologie, molekularer Subtyp, Proliferationsrate).

Desweiteren konnte gezeigt werden, dass FoxM1 eine essentielle Bedeutung für das Wachstum von Medulloblastomzellen sowohl *in vitro* als auch *in vivo* hat. FoxM1 stellt daher ein interessantes therapeutisches Zielmolekül dar. Außerdem wurde in dieser Arbeit der Effekt eines potenziellen Inhibitors von FoxM1, Siomycin A, auf das Proteinlevel von FoxM1 und die damit verbundene Auswirkung auf das Tumorwachstum ebenso überprüft. Die Experimente stellen damit eine Grundlage für zukünftige klinische Studien dar, in denen FoxM1 als prognostischer Marker zur Klassifizierung von Patienten verwendet wird sowie für die Verwendung von Siomycin A als ein neues Chemotherapeutikum zur Behandlung des Medulloblastoms.

Die funktionale Bedeutung von FoxM1 für den Tumor wurde anhand von Knock-down-Experimenten mit vier humanen Medulloblastomzelllinien untersucht. Außerdem wurden die Zelllinien mit Siomycin A behandelt und der Effekt des Thiazols auf das Proteinlevel von FoxM1 und weitergehend auf das Zellwachstum bestimmt. Lentiviraler Knock-down von FoxM1 führte zu einer signifikanten Reduktion der Zellviabilität aller Medulloblastomzelllinien, die durch eine Fehlausbildung der Spindel während der Mitose und durch die Caspase-abhängige *mitotic catastrophe* verursacht wurde. Die Behandlung der Medulloblastomzellen mit Siomycin A inhibierte dabei die Expression von FoxM1 und das Wachstum der Tumorzellen in gleicher Art und Weise.

Die Sensitivität der Medulloblastomzelllinien auf die häufig eingesetzten Chemotherapeutika Cisplatin und Vincristin konnte durch eine Überexpression von FoxM1 nicht beeinflusst werden. Die Wirkweise der beiden Chemotherapeutika scheint unabhängig vom Gesamtproteinlevel von FoxM1 zu sein. Somit stellt FoxM1 ein neues Zielmolekül zur Be-

handlung des Medulloblastoms dar.

Die erzielten Ergebnisse konnten *in vivo* bestätigt werden. Sowohl Versuche im transgenen Mausmodell als auch Tierexperimente mit Xenograftmodellen konnten zeigen, dass das die Tumorprogression von FoxM1 abhängig ist. Durch gezielte Blockade von FoxM1 konnte das Tumorwachstum signifikant inhibiert werden.

Darauf aufbauend müssen weitergehende Untersuchungen klären, inwieweit FoxM1 in der Klinik als prognostischer Marker bei Patienten und als *drug target* zur Behandlung des Medulloblastoms geeignet ist.

Summary

Medulloblastoma is the most common malignant brain tumor occurring in childhood. It is related to poor survival rates of only 60 - 70 % (Northcott et al., 2012). As such the development of causal therapies is highly desired.

We evaluated the expression of „Forkhead box M1“ (FoxM1) and its prognostic value in two independent series of human medulloblastoma samples. FoxM1 is a key regulator of cell cycle progression and increased levels of FoxM1 expression have been detected in many different types of human cancer. Analysing the survival of patients, we found that expression of FoxM1 is a prognostic marker that is independent from all other clinical parameters (M stage, histology, molecular subgroup, proliferation).

We further show that FoxM1 is essential for the growth of medulloblastoma cells *in vitro* as well as *in vivo* and may serve as therapeutic target. We tested whether siomycin A, a potential inhibitor of FoxM1, was able to reduce levels of FoxM1 in medulloblastoma cells and hence to inhibit tumor cell growth. These studies may therefore serve as a basis for clinical trials examining expression of FoxM1 as a prognostic marker to stratify patients and siomycin A as a novel drug to target medulloblastoma.

The functional impact of FoxM1 expression was characterized using knockdown experiments in four human medulloblastoma cell lines, while the thiazole antibiotic siomycin A was tested to determine whether it possessed the ability to downregulate FoxM1 and inhibit tumor cell growth. Knockdown of FoxM1 in medulloblastoma cell lines resulted in a significant decrease of cell viability caused by a failure in mitotic spindle formation and caspase-dependent mitotic catastrophe. Siomycin A inhibited the expression of FoxM1 and the growth of medulloblastoma cells in a similar manner.

Overexpression of FoxM1 did not change the sensitivity of four human medulloblastoma cell lines to commonly used chemotherapeutica Cisplatin and Vincristin. Tumor cell growth was unaffected in all four cell lines indicating that FoxM1 has no influence on mode of action of these chemotherapeutica. Thus FoxM1 is a potential new drug target for treatment of medulloblastoma.

These results were confirmed by *in vivo* experiments. Tumor growth in transgenic models of medulloblastoma, as well as in xenograft models relied on the expression of FoxM1. Blocking of FoxM1 led to significant inhibition of tumor growth *in vivo*.

In summary, FoxM1 may be used as an additional prognostic marker and may present a potential novel target to treat medulloblastoma patients.

Kapitel 1

Einleitung

1.1 Das Medulloblastom

Das Medulloblastom wurde erstmals 1925 als ein Gliom des mittleren Cerebellums in der Literatur erwähnt (Bailey and Cushing, 1925). Damals wurde es unter dem Namen *Medulloblastoma Cerebelli* beschrieben (Bailey and Cushing, 1925). Die Benennung des Tumors in Medulloblastom erfolgte, da Bailey und Cushing annahmen, dass sich der Tumor aus so genannten Medulloblasten entwickelt (Bailey and Cushing, 1925). Medulloblasten waren hypothetische Vorläuferzellen des Gehirns, deren Existenz jedoch niemals nachgewiesen werden konnte (Eberhart, 2007). Bis in die 1990er Jahre hatte die Theorie der Medulloblasten - undifferenzierter, proliferierender embryonaler Zellen, welche sich potentiell in Spongioblasten oder Neuroblasten differenzierten - Bestand (Valtz et al., 1991). Bis heute ist der anatomische Ursprung des Medulloblastoms noch nicht restlos geklärt, teilweise entsteht ein Medulloblastom aus den Körnervorläuferzellen des Kleinhirns (Schüller et al., 2008; Yang et al., 2008).

Farwell and Flannery (1984) geben eine Inzidenz von circa fünf Neuerkrankungen pro 1 Million Kinder an. Dabei findet sich ein Geschlechterunterschied: Mädchen sind im Allgemeinen seltener von Medulloblastomen betroffen (5 Fälle pro 1 Million) als Jungen (7,5 Fälle pro 1 Million) (Crawford et al., 2007). Bei Erwachsenen zwischen 20 und 34 Jahren liegt die Inzidenz des Medulloblastoms bei 1,7 Fälle pro 1 Million und nimmt mit steigendem Alter des Patienten weiter stark ab (Crawford et al., 2007).

Die Fünf-Jahres-Überlebensrate liegt nach neuen Untersuchungen bei circa 66% (Gatta et al., 2009). Goldstandard der Behandlung umfasst neben primärer Resektion kraniospinale Bestrahlung und die Therapie mit verschiedenen Chemotherapeutika, wobei neurologische, intellektuelle, hormonelle und psychosoziale Defizite als teilweise schwere Nebenwirkungen der Therapie auftreten können (Ribi et al., 2005; Walker and Wilne, 2005; Gilbertson, 2004). Daher ist es nötig, neue Behandlungsmethoden und Therapieansätze zu entwickeln und die molekularen Grundlagen der Erkrankung, die teils noch immer ungeklärt sind, im Detail zu untersuchen.

1.1.1 Ursprung und Klassifikation des Medulloblastoms

Das Medulloblastom ist typischerweise im Kleinhirn lokalisiert (Abbildung 1.1A). Es entsteht überall in den Kleinhirnhemisphären, kann allerdings auch von außerhalb des Kleinhirns, beispielsweise vom dorsalen Hirnstamm aus, das Kleinhirn befallen (Gibson et al., 2010). Es wächst lokal infiltrierend, beispielsweise in den unteren Hirnstamm, aber auch *per continuitatem* entlang der Liquorwege. Hierbei können Metastasen im gesamten Liquorraum auftreten. Abhängig vom Alter des Patienten bei der Diagnosestellung können bei bis zu einem Drittel der Patienten bereits primär solide ZNS-Metastasen nachgewiesen werden (Polkinghorn and Tarbell, 2007).

Histologisch wird das Medulloblastom in folgende Subtypen untergeteilt: „klassisch“ (Abbildung 1.2c), „desmoplastisch“, „anaplastisch“ (Abbildung 1.2e), „*large cell medulloblastomas*“ (Abbildung 1.2f) und „extensiv-nodulär“ (Gilbertson and Ellison, 2008). Diese Einteilung ist fließend, daher werden die Medulloblastome des „anaplastischen“ Subtyps und die *large cell medulloblastoma* meist zu den *large cell/anaplastischen* Medulloblastomen (LC/A) zusammengefasst (Gilbertson and Ellison, 2008) sowie die „extensiv-nodulär“ und die „desmoplastischen“ Medulloblastome (Abbildung 1.2d) (Hatten and Roussel, 2011).

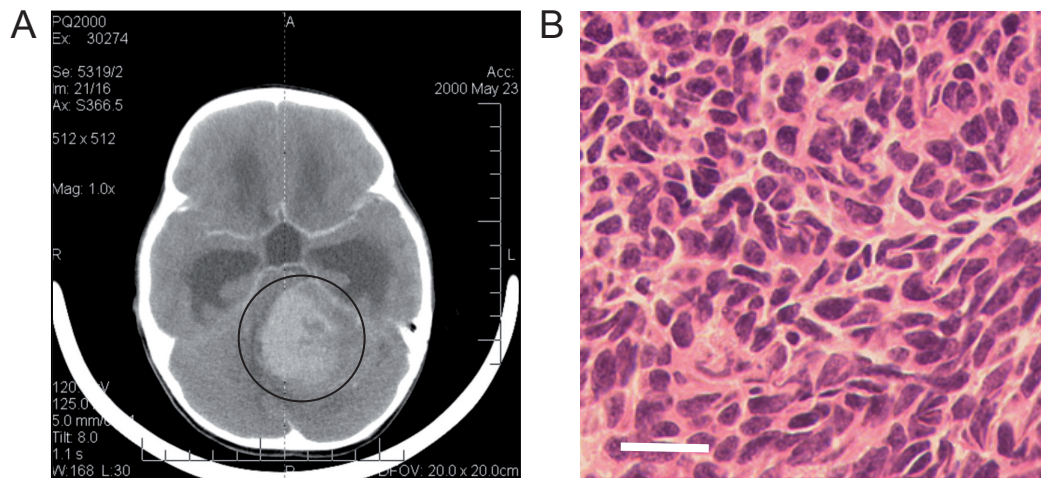


Abbildung 1.1: **Radiologie und Histologie von Medulloblastomen.** (A) Axiale Magnetresonanztomographie eines Medulloblastoms. Das Medulloblastom erscheint heller als das umgebende Gewebe und ist mit einem Kreis markiert. (B) Histologische Färbung eines Medulloblastoms des klassischen Typs. Maßstab=50 μm .

Aufgrund der fortschreitenden Möglichkeiten der molekularen Diagnostik und der Schwierigkeiten, die eine histologische Einteilung mit sich bringt, versucht man heute Medulloblastome nach molekularen Gesichtspunkten zu klassifizieren: Das heißt, die Tumoren werden nach ihrem molekularen Expressionsprofil eingeteilt (Abbildung 1.3). Verschiedene Arbeitsgruppen haben unterschiedliche Kohorten von humanen Medulloblastomen nach dem Transkriptom klassifiziert und übereinstimmend vier unterschiedliche Gruppen nachweisen können (Al-Halabi et al., 2011; Cho et al., 2010; Fattet et al., 2009; Kool et al.,

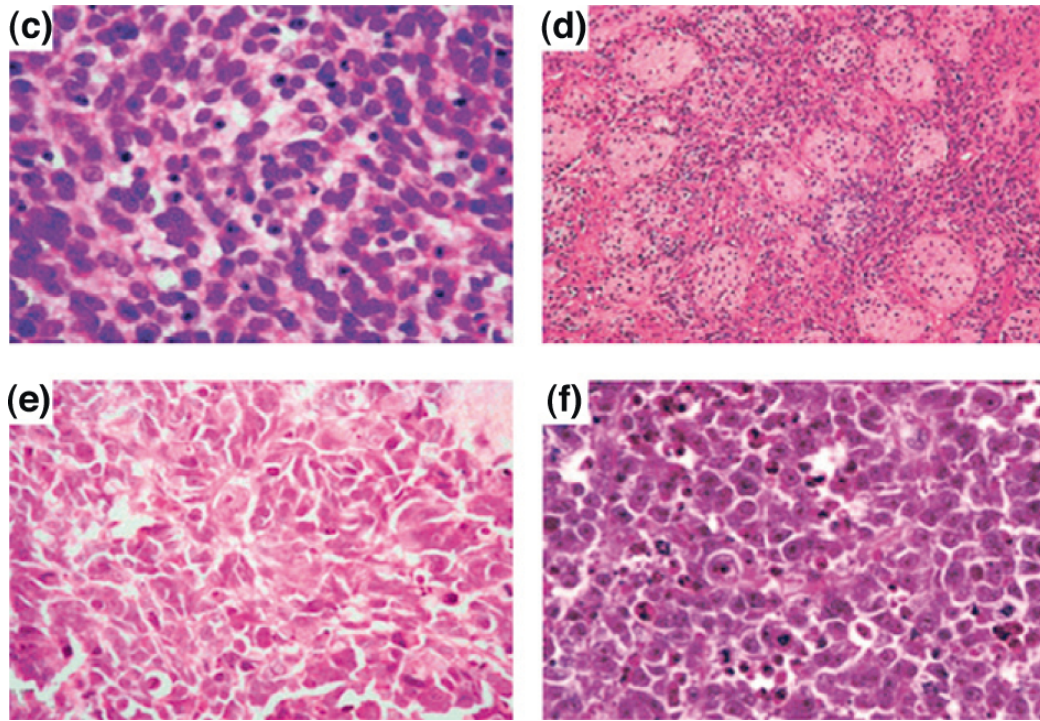


Abbildung 1.2: **Histologische Varianten des Medulloblastoms:** (c) klassisches Medulloblastom, das durch kleine, uniforme Zellen mit großem Zellkern charakterisiert ist; (d) nodular/desmoplastisches Medulloblastom, aufgebaut aus Nodulen aus differenzierten und wenig proliferierenden neurozytischen Zellen sowie desmoplastischen Internodularzonen, die aus hoch proliferierenden pleomorphen Zellen bestehen; (e) anaplastisches Medulloblastom, hoch proliferierende polymorphe Zellen mit einem großen Anteil von apoptotischen Zellen; (f) *large cell medulloblastoma*, bestehend aus Zonen großer Zellen mit einem vesikulären Zellkern und einem einzelnen Nucleolus. In anderen Bereichen des Tumors befinden sich anaplastische Regionen. Verändert aus Hatten and Roussel (2011).

2008; Northcott et al., 2011b, 2009; Pomeroy et al., 2002; Thompson et al., 2006; Taylor et al., 2012).

Zwei Gruppen gehen mit einer gesteigerten Aktivität unterschiedlicher hoch konservierter Signalwege einher - dem Wnt-Signalweg und dem *sonic hedgehog*-Signalweg - und wurden entsprechend benannt. Tumoren des Wnt-Subtyps, also mit einer gesteigerten Aktivität des Wnt-Signalwegs, können dabei normalerweise histologisch dem „klassischen“ Typ zugeordnet werden (Taylor et al., 2012). Die Tumoren dieses Subtyps zeichnen sich oft durch eine Mutation von *CTNNB1* und eine nucleäre Akkumulation von β -Catenin aus (Fattet et al., 2009; Rogers et al., 2009). Ein weiterer charakteristischer Marker für ein Medulloblastom dieses Subtyps ist die Monosomie von Chromosom 6 (Clifford et al., 2006).

Zusätzlich kann oft das Downstream-target DKK1 histologisch nachgewiesen werden (Northcott et al., 2011b; Remke et al., 2011a; Thompson et al., 2006). Patienten mit Me-

dulloblastomen des Wnt-Subtyps haben die beste Prognose im Vergleich zu den Patienten mit Tumoren anderer Subtypen (Ellison et al., 2011; Clifford et al., 2006; Kool et al., 2008; Northcott et al., 2011b; Rogers et al., 2009; Thompson et al., 2006).

Die charakteristische Aktivierung eines hoch konservierten Signalwegs hat zur Namensgebung der zweiten molekularen Gruppe geführt: *sonic hedgehog* (Schwalbe et al., 2011; Cho et al., 2010; Kool et al., 2008; Northcott et al., 2011b; Thompson et al., 2006). Genetische Marker dieses Subtyps sind neben somatischen Mutationen von *PTCH*, *SMO* und *SUFU* (Bale et al., 1998; Brugières et al., 2010; Pastorino et al., 2009; Slade et al., 2011; Taylor et al., 2002) auch Amplifikationen von *GLI1* und *GLI2* (Taylor et al., 2000; Northcott et al., 2011a, 2009). Zudem findet sich oft eine Deletion des langen Arms von Chromosom 9 (9q), auf dem das Gen *PTCH* lokalisiert ist (Hahn et al., 1996; Northcott et al., 2011b; Pietsch et al., 1997).

Typischerweise reagieren diese Tumoren immunhistochemisch positiv auf die Expression von GAB1 (Ellison et al., 2011), GLI1 (Al-Halabi et al., 2011; Northcott et al., 2011b) oder SFRP1 (Remke et al., 2011b,a). Medulloblastome des *sonic hedgehog*-Typs, des am besten untersuchten Subtyps, machen insgesamt circa 25 % der Medulloblastome aus (Hatten and Roussel, 2011).

Die dritte Gruppe zeigt keine spezifische Aktivierung eines bestimmten Signalwegs. Die Klassifizierung erfolgt hierbei durch ein überlappendes Transkriptom mit anderen Medulloblastomen, die weder der Wnt- noch der *sonic hedgehog*-Gruppe zugeordnet werden können (Cho et al., 2010; Kool et al., 2008; Northcott et al., 2011b). Wegen der Überexpression von *MYC* durch diese Tumoren wird diskutiert diese Gruppe als MYC-Gruppe zu bezeichnen (Hatten and Roussel, 2011; Kool et al., 2008; Northcott et al., 2011b). Desweiteren exprimieren diese Tumoren Gene, die wichtig für die Entwicklung der Retina sind (Hatten and Roussel, 2011; Kool et al., 2008; Northcott et al., 2011b). Als immunohistochemischer Marker dieser Gruppe könnte NPR3 dienen (Northcott et al., 2011b).

Die Medulloblastome der Gruppe 3 neigen dazu zu metastasieren, was in Verbindung mit dem häufig auftretenden histologischen Subtyp „*large cell*/anaplastisch“ dazu führt, dass diese Tumoren die schlechteste Prognose haben (Northcott et al., 2011b).

Der letzten Gruppe (Gruppe 4) werden alle anderen Medulloblastome zugeordnet. Diese weisen unbestimmte genetische Abnormalitäten auf und werden wahrscheinlich durch die Expression des Markers KCNA1 charakterisiert (Northcott et al., 2011b; Remke et al., 2011a,b). Außerdem überexprimieren diese Tumoren Gene für neuronale Differenzierung und neuronale Entwicklung, deren Bedeutung für die Tumorentstehung und Progression noch nicht geklärt sind (Hatten and Roussel, 2011; Kool et al., 2008; Northcott et al., 2011b). Obwohl diese Tumoren circa ein Drittel aller Medulloblastome ausmachen, ist am wenigsten über die Pathogenese dieses Subtyps bekannt (Taylor et al., 2012).

Der genaue zelluläre Ursprung des Medulloblastoms ist seit Jahren Gegenstand intensiver Forschung. Basierend auf den dysregulierten Signalwegen in humanen Medulloblastomen wurden konditionale Mauslinien entwickelt, um in lokal und zeitlich genau definierten Zellpopulationen eine Aktivierung der Signalwege zu erreichen (Jeong et al., 2004; Harada et al., 1999). Es konnte gezeigt werden, dass Shh-abhängige Medulloblastome aus Math1⁺ Körnervorläuferzellen des Cerebellums hervorgehen können. Dabei wurde eine Akt-














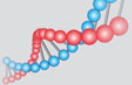




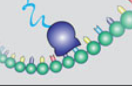
Molecular Subgroups of Medulloblastoma				
CONSENSUS	WNT	SHH	Group 3	Group 4
Cho (2010)	C6	C3	C1/C5	C2/C4
Northcott (2010)	WNT	SHH	Group C	Group D
Kool (2008)	A	B	E	C/D
Thompson (2006)	B	C', D	E, A	A, C
DEMOGRAPHICS				
Age Group:   	 	  	 	  
Gender: ♀ ♂	♂ ♂ : ♀ ♀	♂ ♂ : ♀ ♀	♂ ♂ : ♀	♂ ♂ : ♀
CLINICAL FEATURES				
Histology	classic, rarely LCA	desmoplastic/nodular, classic, LCA	classic, LCA	classic, LCA
Metastasis	rarely M+	uncommonly M+	very frequently M+	frequently M+
Prognosis	very good	infants good, others intermediate	poor	intermediate
GENETICS				
	 CTNNB1 mutation	 PTCH1/SMO/SUFU mutation GLI2 amplification MYCN amplification	 i17q MYC amplification	 i17q CDK6 amplification MYCN amplification
GENE EXPRESSION				
	WNT signaling MYC +	SHH signaling MYCN +	Photoreceptor/GABAergic MYC +++	Neuronal/Glutamatergic minimal MYC / MYCN

Abbildung 1.3: **Molekulare Klassifikation von Medulloblastomen.** Aktuelle molekulare und histologische Klassifikation von Medulloblastomen. Aus: Taylor et al. (2012)

vierung des *sonic hedgehog*-Signalweg entweder durch das Einbringen einer aktivierenden Komponente (*Math1-cre::SmoM2-YFP^{fl/+}*, (Schüller et al., 2008)) oder durch die Deletion eines Inhibitors (*Math1-cre::ptch1^{fl/fl}*, (Yang et al., 2008)) erreicht. Eine konstitutive Aktivierung des Wnt-Signalwegs in *Math1⁺*-Körnervorläuferzellen (*Math1-cre::Apc^{fl/fl}* oder *Math1-cre::Ctnnb1(ex3)^{fl/+}*) führte dabei nicht zu einem Medulloblastom, die Proliferation der Körnervorläuferzellen wurde jedoch inhibiert (Lorenz et al., 2011). Gibson et al. (2010) vermuten aufgrund des Expressionsprofils den zellulären Ursprung von Wnt-assoziierten Medulloblastomen in Vorläuferzellen der Rhombischen Lippe.

1.1.2 Symptome, Diagnostik und Therapie des Medulloblastoms

Erste klinische Symptome des Medulloblastoms umfassen unspezifische Charakteristika eines erhöhten Hirndrucks - Ataxie und Sehstörungen, sowie Kopfschmerz, morgendliche Übelkeit und Erbrechen (Alston et al., 2003). Kleinkinder zeigen oft eine Vergrößerung des Kopfes bis hin zum Hydrozephalus, da der Tumor oft die Zirkulation der Cerebrospinalflüssigkeit blockiert. Durch allmähliche Steigerung des Hirndrucks, nehmen die Kopfschmerzen, die morgendliche Übelkeit und Benommenheit des Patienten in Laufe der Zeit zu.

Andere, ebenfalls eher unspezifische Symptome treten auf, je nachdem, welche Hirnstrukturen durch das infiltrative Wachstum des Medulloblastoms betroffen sind. Hauptsächlich findet sich das Medulloblastom im Kleinhirn, das an der Steuerung der Motorik beteiligt ist. Somit sind Schwindel und Koordinationsprobleme nicht selten.

Diagnostiziert wird das Medulloblastom durch bildgebende Verfahren. Die Magnetresonanztomographie (MRT) kann hierbei Größe, Lokalisation und die Ausdehnung des Tumors darstellen. Die Sicherung der Diagnose erfolgt anhand der histologischen Untersuchung des chirurgisch entfernten Tumors. Goldstandard der Behandlung des Medulloblastoms ist eine Kombination aus maximaler Resektion des Tumorgewebes (Tait et al., 1990), Radiotherapie des Ortes des Primärtumors sowie der Kraniospinalachse, da der Tumor zur Metastasierung entlang dieser Achse neigt (Hughes et al., 1988; Kortmann et al., 2000; Tarbell et al., 1991) und eine systemische Chemotherapie (Evans et al., 1990; Taylor et al., 2003). Die Strahlentherapie wird nach einem genau festgelegten Therapieplan durchgeführt. Dabei wird die hintere Schädelgrube und somit das ursprüngliche Tumorbett mit einer Gesamtdosis von 54 Gy, sowie die Kraniospinalachse mit Gesamtdosen zwischen 24 Gy und 36 Gy bestrahlt (Weiss and Hess, 1999). Bei Kleinkindern unter drei Jahren wird aufgrund möglicher psychomotorischer und kognitiver Entwicklungsstörungen als Folge der Radiotherapie meist auf eine Bestrahlung verzichtet (Duffner et al., 1993). Dabei wird die Zeit bis zur möglichen zusätzlichen Bestrahlung mit alleiniger Chemotherapie überbrückt. Standardmäßig wird für die Chemotherapie eine Kombination aus drei verschiedenen Chemotherapeutika verabreicht. Diese sind Nitrosoharnstoffderivate (CCNU oder BCNU), Platinderivate (Cisplatin oder Carboplatin) und Alkaloide (Vincristin oder Etoposid) (Packer et al., 1999; Zeltzer et al., 1999).

Mögliche Nebenwirkungen einer Strahlen- bzw. Chemotherapie sind Störungen im Verdauungstrakt wie Übelkeit, Erbrechen und Durchfall. Durch die Applikation der energiereichen Strahlung kann es zu einem Ödem, einer Reizung und auch Rötung der Haut und lokal begrenzten Haarausfall kommen, der durch zusätzlich verabreichte Zytostatika auch systemisch auftreten kann. Radiotherapie führt oft zu einer starken Müdigkeit, sowie Fieber, Appetitlosigkeit, Schwindelgefühl und Sehstörungen. Chemotherapie schädigt unspezifisch alle proliferativ aktiven Zellen, auch Zellen des Knochenmarks, und erhöht daher die Infektionsgefahr und die Blutungsneigung.

1.1.3 Wichtige Signalwege beim Medulloblastom

Die Fehlregulationen evolutionär hoch konservierter Entwicklungskontrollsignalwege können zur Störung der postnatalen Entwicklung der Kleinhirnrinde und zur Entstehung von Medulloblastomen führen. Diese Signalwege sind einerseits der *sonic hedgehog*-Signalweg (Shh-Signalweg) und andererseits der Wnt-Signalweg.

Im Grundzustand des Hedgehog-Signalwegs binden zwei membranständige Proteine mit hoher Affinität aneinander (Abbildung 1.4, (Stone et al., 1996)). Smoothend, ein G-Protein-gekoppeltes Rezeptormolekül, wird durch die Interaktion mit dem Transmembranprotein Patched inhibiert, wodurch eine Aktivierung des Signalwegs verhindert wird (Chen and Struhl, 1996). Bindet *hedgehog*-Protein (in Säugetieren kann der Hedgehog-Signalweg

durch drei verschiedene Proteine (*sonic hedgehog*, *indian hedgehog* und *desert hedgehog*) aktiviert werden und wird entsprechend benannt (Echelard et al., 1993)) an die extrazelluläre Domäne von Patched, wird der Proteinkomplex aus Patched und Smoothend zerstört. Smoothend kann anschließend das Signal in die Zelle weitergeben. Hierfür wandert Smoothend in das primäre Cilium der Zelle (Corbit et al., 2005; Wang et al., 2009b) und bewirkt eine Dissoziation des Proteinkomplexes aus SuFu (*Suppressor of fused homolog*) und den Transkriptionsfaktoren der Gli-Familie (Gli2 und Gli3, (Huangfu and Anderson, 2006; Lum and Beachy, 2004)). Die Transkriptionsfaktoren werden freigesetzt und wandern in den Nucleus (Aza-Blanc et al., 1997).

Dort agieren sie als Transkriptionssuppressor (Gli3, (Persson et al., 2002)) oder initiieren die Aktivierung (Gli2, (Bai et al., 2002)) verschiedener Zielgene wie *GLI1*, *CCND1*, *CCNE1*, *PTCH1* und *MYC*.

Sonic hedgehog und *indian hedgehog* spielen eine wichtige Rolle bei der neuronalen Entwicklung, wobei der gut charakterisierte *sonic hedgehog*-Signalweg einen grundlegenden Beitrag zur Entwicklung, Strukturbildung und Differenzierung des Nervensystems liefert (Chiang et al., 1996; Wijgerde et al., 2002). Während der Entwicklung des Cerebellums ist die Aktivierung des *sonic hedgehog*-Signalwegs für die Proliferation der Körnervorläuferzellen notwendig (Wechsler-Reya and Scott, 1999). Diese Zellen proliferieren in der Rhombischen Lippe und migrieren anschließend in den Cortex und bilden die äußere Körnerzellschicht (*external granular layer*, EGL) (Altman and Bayer, 1996). Anschließend durchwandern die Körnerzellen die EGL und bilden die innere Körnerzellschicht (*inner granular layer*, IGL). Für diesen Prozess ist ein Gradient von *sonic hedgehog*-Protein verantwortlich (Wallace, 1999).

Erste Hinweise auf eine Beteiligung des *sonic hedgehog*-Signalwegs bei der Ausbildung von Medulloblastomen ergaben sich aus der Tatsache, dass Patienten mit dem Gorlin-Goltz-Syndrom, das durch den heterozygoten Verlust von *PTC* (Patched) entsteht, auch zur Ausbildung von Medulloblastomen neigen (Hahn et al., 1996). Heutzutage ist bekannt, dass circa ein Viertel aller Medulloblastome eine verstärkte Aktivierung des *sonic hedgehog*-Signalwegs zeigen (Hatten and Roussel, 2011). Tierexperimentelle Arbeiten konnten nachweisen, dass Medulloblastome aufgrund einer Aktivierung des *sonic hedgehog*-Signalwegs in bestimmten Vorläuferpopulationen induziert werden können (Goodrich et al., 1997; Yang et al., 2008; Oliver et al., 2005; Mao et al., 2006; Schüller et al., 2008; Grammel et al., 2012).

Der zweite Signalweg, der bei Medulloblastomen eine wichtige Rolle spielt, ist der Wnt-Signalweg. Dieser ist bei rund 15 % der Medulloblastome pathologisch verändert (Hatten and Roussel, 2011). Es scheint, dass Medulloblastome, die molekular durch die Aktivierung des Wnt-Signalwegs charakterisiert sind, den molekularen Subtyp mit der besten Prognose darstellen (Taylor et al., 2012). Entdeckt wurde der Zusammenhang zwischen Aktivierung des Wnt-Signalwegs und Medulloblastomen bei Patienten mit Turcot-Syndrom. Diese weisen eine genetisch bedingte Aktivierung des Wnt-Signalwegs auf und haben ein stark erhöhtes Risiko für die Entwicklung von Medulloblastomen (Hamilton et al., 1995).

Im inaktiven Zustand des Wnt-Signalwegs liegt β -Catenin phosphoryliert vor (Abbildung 1.4, (Amit et al., 2002)). Ein Proteinkomplex aus APC, Axin, Ck1 α und GSK-3 β

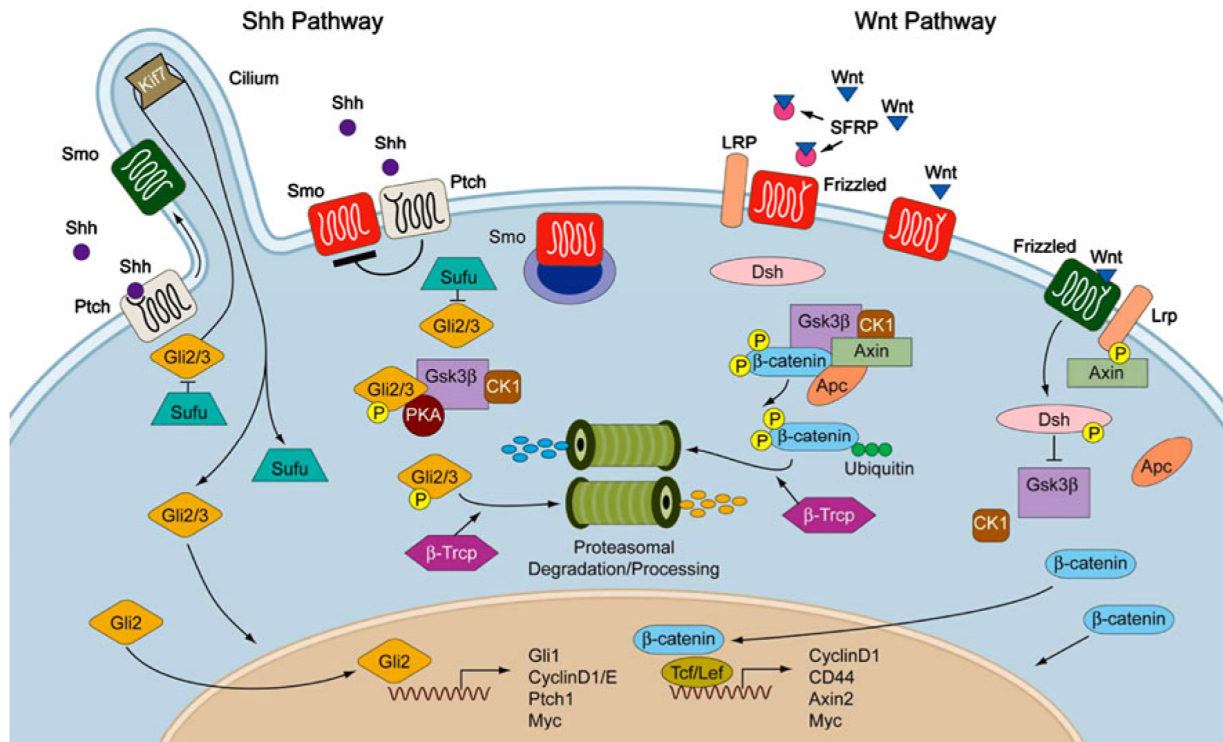


Abbildung 1.4: **Shh- und Wnt-Signalweg.** Bei inaktivem Shh-Signalweg inhibiert der Patched-Rezeptor (Ptch) den Smoothend-Rezeptor (inaktiver Smoothend-Rezeptor, rot), da er die Translokation von Smoothend in das primäre Cilium verhindert. Manche Smoothend Proteine werden durch Endozytose aufgenommen und in Endosome geschleust (blau). SuFu bindet Gli2 und Gli3, Downstream-targets des Shh-Signalwegs, im Zytoplasma und primären Cilium. Gli2 wird zusätzlich noch durch Proteasome abgebaut. Bei Aktivierung des Shh-Signalwegs dissoziiert Ptch von Smoothend (aktiver Smoothend-Rezeptor, grün), das dann in das primäre Cilium wandert. SuFu bindet nicht länger Gli2 und Gli3, die in den Nucleus translokieren und als Transkriptionsfaktoren wirken. Während des inaktiven Wnt-Signalwegs (inaktiver Frizzled-Rezeptor, rot) wird β -Catenin phosphoryliert und an einem Proteinkomplex gebunden, der proteasomal abgebaut wird. Die Aktivierung des Wnt-Signalwegs (aktiver Frizzled-Rezeptor, grün) zerstört den Proteinkomplex, so dass β -Catenin in den Nucleus gelangen kann und als transkriptionaler Aktivator wirkt. SFRP kann an Wnt binden und so die Interaktion des Liganden mit dem Rezeptor verhindern. Aus: Ellison (2010)

sorgt für die Ubiquitinierung des phosphorylierten β -Catenins (Behrens et al., 1998; Hamada et al., 1999; Itoh et al., 1998), das zum proteosomalen Verdau führt (Aberle et al., 1997). Bindet ein Wnt-Agonist an den Transmembranrezeptor Frizzled (Bhanot et al., 1996; Dann et al., 2001), führt eine intrazelluläre Signalkaskade zur Dephosphorylierung von β -Catenin, das dadurch nicht mehr durch den Proteinkomplex ubiquitiniert und anschließend nicht mehr abgebaut wird (Salic et al., 2000). β -Catenin kann nun in den Nucleus gelangen und dort als Transkriptionsaktivator agieren (Tolwinski and Wieschaus, 2004). Es induziert dort die Expression von Wnt-Zielgenen wie *CD44*, *AXIN2*, *DKK1* und *MYC* (Chamorro et al., 2005; He et al., 1998; Jho et al., 2002; Wielenga et al., 1999).

1.1.4 Mausmodelle des Medulloblastoms

Analog zu den humanen Tumoren existieren verschiedene Mausmodelle für das Medulloblastom, die auf der Aktivierung verschiedener Signalwege basieren. Einerseits werden verschiedene Komponenten des *sonic hedgehog*-Signalwegs verändert, um eine Aktivierung des Signalwegs zu erreichen (Corcoran and Scott, 2001; Hallahan et al., 2004; Mao et al., 2006; Goodrich et al., 1997), andererseits wird durch die Aktivierung des Wnt-Signalwegs die Bildung eines Medulloblastoms induziert (Gibson et al., 2010).

Der konventionelle heterozygote Knock-out von *patched* (*ptc*), einem inhibierenden, membranständigen Protein des *sonic hedgehog*-Signalwegs, führt im Mausmodell zur Bildung eines Medulloblastoms (Goodrich et al., 1997). Dabei wurde durch den Genotyp *ptch*^{+/-} eine Reduktion von Patched-Transkripten auf 50 % erreicht. Damit ging eine Medulloblastompenetranz von circa 20 % einher. Wetmore et al. (2001) konnten durch das Einkreuzen des *p53*^{-/-}-Hintergrundes in die *ptch*^{+/-}-Mäuse die Medulloblastompenetranz auf 95 % steigern.

Eine andere Komponente des *sonic hedgehog*-Signalwegs ist ein weiteres membranständiges Protein, *smoothend* (*smo*) (Alcedo et al., 1996). Die konditionale, ubiquitäre Aktivierung des *sonic hedgehog*-Signalwegs über eine mutierte Form von *smo* führt im Mausmodell bei circa 40 % der betroffenen Mäuse ebenfalls zur Ausbildung von Medulloblastomen (Mao et al., 2006). Die mutierte Form von smoothend hat in der siebten Transmembrandomäne an Position 535 eine Aminosäuresubstitution (Tryptophan/Leucin), die zur Folge hat, dass die Inhibierung über patched nicht mehr stattfinden kann und somit zur dauerhaften Aktivierung des Signalweges führt (Xie et al., 1998).

Durch die gezielte Manipulation des *sonic hedgehog*-Signalwegs mittels konditionaler Knock-out-Modelle konnte die Medulloblastompenetranz weiter gesteigert werden und somit tiefere Einblicke in die Tumorprogression gewonnen werden. Schüller et al. (2008) konnten durch die spezifische Aktivierung des *sonic hedgehog*-Signalwegs in Math1⁺ oder hGFAP⁺ neuronalen Zellen eine Penetranz von 100 % erreichen. In diesem Experiment wurde der *sonic hedgehog*-Signalweg sowohl in Körnervorläuferzellen (Math1⁺-Zellen), als auch in neuronalen Vorläuferzellen (hGFAP⁺-Zellen) aktiviert (Yang et al., 2008).

Neben den Modellen für die *sonic hedgehog*-abhängigen Tumoren existiert auch ein Mausmodell für das Medulloblastom, das durch die Aktivierung des Wnt-Signalwegs induziert wird. Hier wird eine mutierte Form von β -catenin (Harada et al., 1999) in neuronalen

Vorläuferzellen (hGFAP⁺-Zellen) exprimiert, was zur Tumorentstehung führt (Gibson et al., 2010). Der mutierten Form des β -Catenins fehlt Exon 3 (*Ctnnb*^{+/lox(ex3)}), das dadurch nicht mehr phosphoryliert und abgebaut werden kann und somit im Nucleus als Transkriptionsfaktor wirken kann (Harada et al., 1999).

Interessanterweise scheinen *sonic hedgehog*- und Wnt-abhängige Medulloblastome im Mausmodell unterschiedlichen zellulären Ursprungs zu sein (Gibson et al., 2010). Neueste Untersuchungen lassen vermuten, dass sich die „cell of origin“ bei *sonic hedgehog*-assoziierten Medulloblastomen in der oberen Rhombischen Lippe oder im auditorischen Teil der unteren rhombischen Lippe befindet und dass der zelluläre Ursprung von Wnt-assoziierten Tumoren im precerebellären Teil der Rhombischen Lippe liegt (Grammel et al., 2012).

1.2 Die Familie der Forkhead-Box-Proteine

Das erste Gen aus der Familie der Forkhead-Box-Proteine wurde 1989 von Weigel et al. beschrieben. In Experimenten mit Embryonen von *Drosophila melanogaster* konnten sie nachweisen, dass das Gen eine wichtige Rolle bei der segmentalen Entwicklung spielt. Als Gemeinsamkeit zeigen alle Proteine eine stark homologe, circa 100 Aminosäuren umfassende Region, die als DNA-bindende Domäne (DBD) fungiert (Carlsson and Mahlapuu, 2002). Nach neuesten Forschungsergebnissen umfasst die Gruppe der Forkhead-Box-Proteine insgesamt über 2000 verschiedene Proteine, die in 108 verschiedenen Tier- und Pilzarten identifiziert werden konnten (Benayoun et al., 2011). Interessanterweise steht die Anzahl der verschiedenen Forkhead-Box-Genen einer bestimmten Art in Beziehung zu der Komplexität der Art. Der Pilz *Aspergillus flavus* hat nur ein Forkhead-Box-Protein-kodierendes Gen, die Hefe *Saccharomyces cerevisiae* dagegen vier. Diese numerische Diversität setzt sich bei den Metazoa fort. Der Fadenwurm *Caenorhabditis elegans* besitzt 16 Forkhead Gene, *Drosophila melanogaster* 18, *Danio rerio* 49 und der *Homo sapiens* 50. Im Jahr 2000 wurde eine einheitliche Nomenklatur der Forkhead-Box-Proteine von Kaestner et al. eingeführt. Seitdem wird eine Zugehörigkeit eines Proteins zur Familie der Forkhead-Box-Proteine durch die Buchstaben FOX (Forkhead Box) im Namen verdeutlicht. Ein weiterer Buchstabe zeigt die Subfamilie an. Derzeit sind 19 verschiedene Subfamilien (A-S) bekannt (Hannenhalli and Kaestner, 2009). Die Struktur des Komplexes einer Forkhead-Domäne (FHD) mit gebundener DNA wurde erstmals 1993 von Clark et al. mit Hilfe der Röntgenstrukturanalyse aufgeklärt. Die FHD besteht aus drei N-terminalen α -Helices, drei β -Strängen und zwei Abschnitten, welche schleifenförmig in Richtung C-Terminus weisen. Die transkriptionelle Aktivität vieler Forkhead-Box-Proteine kann durch posttranslationale Modifikationen verändert werden. Sie können an Serin, Threonin und Tyrosin phosphoryliert werden (Calnan and Brunet, 2008; Greer et al., 2007; Tan et al., 2007) sowie an Lysin acetyliert und/oder deacetyliert werden (Benayoun et al., 2009; Li et al., 2007). Desweiteren ist bekannt, daß die Transkriptionsfaktoren an Arginin methyliert und durch die Addition von β -N-Acetylglucosamin an Serin oder Threonin verändert werden können (Caldwell et al., 2010; Ho et al., 2010; Yamagata et al., 2008). Diese Modifikationen beeinflussen die Aktivität, die zelluläre Lokalisation und die Stabilität der Forkhead-Box-Proteine.

1.2.1 Der Transkriptionsfaktor FoxM1

Der Transkriptionsfaktor FoxM1 ist bereits seit 1994, damals unter dem Namen MPP2, bekannt (Westendorf et al., 1994). Weitere früher verwendete Namen sind HFH-11 (*hepatocyte nuclear factor 3/forkhead homolog-11*) (Ye et al., 1997), WIN (*winged helix factor from INS-1 cells*) (Yao et al., 1997), FKHL16 (*forkhead, drosophila, homolog-like16*), MPP-2 (*MPM2-reactive phosphoprotein 2, M-Phase phosphoprotein-2*) (Matsumoto-Taniura et al., 1996; Lüscher-Firzlaff et al., 1999; Westendorf et al., 1994) und Trident (Korver et al., 1997b,a). Im Zuge der Vereinheitlichung der Nomenklatur der Forkhead-Box-Proteine wurde im Jahr 2000 der Name FoxM1 festgelegt (Kaestner et al., 2000). Das Gen *FOXM1* ist auf Chromosom 12 an Position p13-3 lokalisiert und kodiert für insgesamt zehn Exone

(Korver et al., 1997a). Durch alternative Spleißmechanismen kommt es zur Ausbildung von drei unterschiedlichen FoxM1 Isoformen (Abbildung 1.5; Ye et al. (1997)). FoxM1A zeigt typische Merkmale eines Transkriptionsrepressors (Ye et al., 1997), während die beiden anderen Isoformen von FoxM1 (B und C) als Transkriptionsaktivatoren wirken (Kim et al., 2005; Ma et al., 2005; Tan et al., 2006; Wierstra and Alves, 2007a,c; Wang et al., 2002, 2005). In der vorliegenden Arbeit wurde Splicingvariante FoxM1B untersucht und im weiteren als FoxM1 bezeichnet. FoxM1 wird hauptsächlich in fetalem Gewebe exprimiert (Ye et al., 1997). Die Expression von FoxM1 kann jedoch auch in proliferierendem adulten Gewebe nachgewiesen werden (Laoukili et al., 2005; Wang et al., 2005; Krupczak-Hollis et al., 2004).

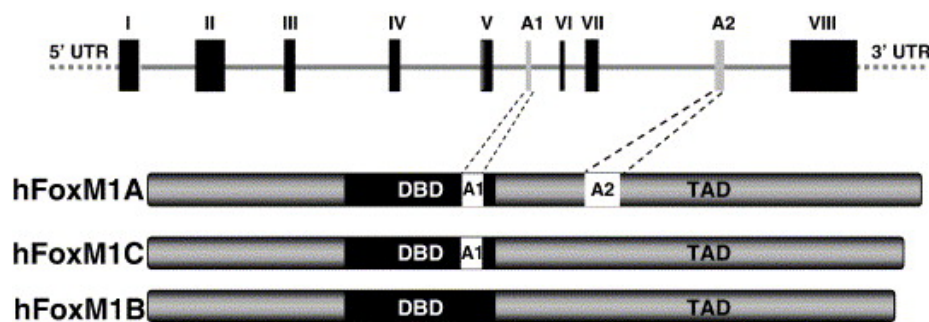


Abbildung 1.5: Das humane *FOXM1* Gen befindet sich auf Chromosom 12 an Position p13-3 und kodiert für ein 3,4 kb bis 3,6 kb langes mRNA-Fragment. Differentielles Spleißen der Exone Va (A1) und VIIa (A2) führt zu drei Klassen von Transkripten, die für unterschiedliche FOXM1 Proteinisoformen kodieren: FOXM1A enthält beide alternativen Exone, FOXM1B enthält keines der alternativen Exone und FOXM1C enthält nur Exon Va. DBD=DNA bindende Domäne; TAD=Transaktivierungsdomäne. Verändert nach: Laoukili et al. (2007)

1.2.2 Physiologische Bedeutung von FoxM1

Der Transkriptionsfaktor FoxM1 spielt eine wichtige Rolle im biologischen System der Zelle. Derzeit sind circa 50 Gene bekannt, die direkt von FoxM1 reguliert werden (Wierstra and Alves, 2007b). In Microarraystudien konnten weitere von FoxM1 beeinflusste Gene identifiziert werden sowie zusätzliche 22 Zielgene von FoxM1, die durch Promoterbindungsstudien mit Chromatinimmunopräzipitationsversuchen (ChIPs), DNA-Präzipitationsversuchen (DNAPs) und *electrophoretic mobility shift assays* (EMSAs) identifiziert wurden (Wierstra and Alves, 2006; Ye et al., 1997; Wang et al., 2005; Tan et al., 2006, 2007; Ma et al., 2005; Laoukili et al., 2005; Kim et al., 2005).

FoxM1 reguliert Gene, die für viele verschiedene Funktionen der Zelle erforderlich sind. Innerhalb des Zellzyklus ist FoxM1 entscheidend für den Übergang zwischen G₁ und der S-Phase, da FoxM1 Gene wie *S-phase kinase-associated protein 2* (*p45*) und *CDC28 protein*

kinase regulatory subunit 1B reguliert (Wang et al., 2005; Ye et al., 1999). Weiterhin kontrolliert FoxM1 *cell division cycle 25 homolog B* (*S. pombe*), *cyclin B1* und *cyclin-dependent kinase 1*, die den Übertritt von G₂ in die M-Phase steuern (Zhao et al., 2006; Wang et al., 2002). Weitere Gene, deren Expression von FoxM1 gesteuert wird, sind *centromere protein A*, *centromere protein B* und *centromere protein F*, die für den korrekten Ablauf der Mitose wichtig sind (Costa, 2005; Wang et al., 2005; Laoukili et al., 2005; Wang et al., 2002). *FOXM1* selbst ist ein Zellzyklus-reguliertes Gen (Whitfield et al., 2006). Außerdem wurde in synchronisierten HeLa-Zellen gezeigt, dass *FOXM1* periodisch exprimiert wird und dabei das maximale Expressionsniveau beim Übergang von G₂- nach S-Phase erreicht wird (Whitfield et al., 2002).

1.2.3 Onkologische Bedeutung von FoxM1

Ausgehend von seiner physiologischen Bedeutung wurde die Rolle von FoxM1 in der Tumorgenese intensiv untersucht. In der Tat ist FoxM1 daran beteiligt (Costa, 2005; Dai et al., 2010; Kalinichenko et al., 2004; Laoukili et al., 2007; Radhakrishnan et al., 2006; Kalin et al., 2006; Kim et al., 2006; Liu et al., 2006; Gusarova et al., 2007; Yoshida et al., 2007) und es ist in einer Vielzahl verschiedenster Tumoren überexprimiert (hepatozelluläres Karzinom (Sun et al., 2011), intrahepatisches Gallengangskarzinom (Obama et al., 2005), Magen- (Nakamura et al., 2004) und Dickdarm-Adenokarzinom (Yoshida et al., 2007), duktales Pankreasadenokarzinom (Xia et al., 2012), nicht-kleinzelliges Bronchialkarzinom (NSCLC) (Kim et al., 2006), Glioblastom (Lin et al., 2010; Liu et al., 2006) und anaplastisches Astrozytom (van den Boom et al., 2003), Basalzellkarzinom (Teh et al., 2002), Mammakarzinom (Francis et al., 2009), Karzinom des Eierstocks (Network, 2011) und des Gebärmutterhalses (Guan et al., 2011), Prostata-Adenokarzinom (Kalin et al., 2006), Harnblasen- und Nierenzellkarzinom (Pilarsky et al., 2004)).

Bei verschiedenen Tumoren des Gehirns konnte nachgewiesen werden, dass das Expressionsniveau von *FOXM1* positiv mit steigendem Tumorgad korreliert ist (van den Boom et al., 2003; Liu et al., 2006). Die *World Health Organization* (WHO) hat 2007 vier Grade von Hirntumoren festgelegt (Louis et al., 2007). Der WHO-Grad I entspricht einem gutartigen, langsam wachsenden Tumor mit günstiger Prognose und guter Heilungschance. Im Gegensatz dazu wird der WHO-Grad IV für bösartige, rasch proliferierende Tumoren mit ungünstiger Prognose vergeben, die mit den gegenwärtig verfügbaren Behandlungsmethoden zumeist nicht heilbar sind.

Zudem zeigten Liu et al. (2006) an 50 „Glioblastoma multiforme“, dass das Level von FoxM1 mit dem Überleben des Patienten korreliert ist. Bei metastasierenden Tumoren findet sich mehr FoxM1 in den Metastasen als im Primärtumor (Chandran et al., 2007). In verschiedenen Tumoren spielt FoxM1 eine wichtige Rolle bei der Initiation und bei der Progression des Tumors (Gusarova et al., 2007; Kalin et al., 2006; Kalinichenko et al., 2004; Yoshida et al., 2007). Dai et al. (2007) konnten nachweisen, dass FoxM1 die Invasivität von Gliomazellen steigert.

FoxM1 stellt somit ein mögliches Ziel von Chemotherapeutika dar. Zwei potenzielle Kandidaten wurden bereits *in vitro* erprobt. Das Peptid ARF₂₆₋₄₄ (*alternative reading fra-*

me₂₆₋₄₄) und Siomycin A, ein niedermolekulares Thiazolderivat, reduzierten signifikant das FoxM1-abhängige Wachstum von Tumorzellen auf Softagar (Kalinichenko et al., 2004; Radhakrishnan et al., 2006). Bei der Behandlung der Tumorzellen mit Siomycin A konnte zudem eine Inhibierung der FoxM1-mRNA, der Proteinexpression und der transkriptionellen Aktivität des Transkriptionsfaktors nachgewiesen werden (Radhakrishnan et al., 2006).

1.3 Zielsetzung der Arbeit

Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe konnten zeigen, dass FoxM1 in den Körnerzellvorläuferzellen stark exprimiert wird (Schüller et al., 2007). Ebenso konnten Schüller et al. (2008) zeigen, dass sich Medulloblastome aus diesen Vorläuferzellen entwickeln können.

Ein Ziel dieser Arbeit war es zu untersuchen, welche Rolle FoxM1 im humanen Medulloblastom spielt. Dafür wurden humane Proben auf die Expression von FoxM1 hin untersucht, und die Abhängigkeit des Überlebens des Patienten vom Expressionsniveau bestimmt. Ferner wurde die physiologische Bedeutung von FoxM1 in humanen Medulloblastomzelllinien charakterisiert, wozu FoxM1 mittels RNAi-Technologie aus den Zellen entfernt wurde. Außerdem wurde die Behandlung der Zelllinien mit Siomycin A durchgeführt und somit die chemotherapeutischen Möglichkeiten von Siomycin A für das Medulloblastom untersucht.

Die Bedeutung von FoxM1 wurde ebenfalls *in vivo* charakterisiert. FoxM1 wurde mittels des Cre-loxP-Systems aus einem Mausmodell für das Medulloblastom entfernt und es wurden dessen Auswirkungen auf die Karzinogenese bestimmt. Es wurden zudem die Behandlung des Medulloblastoms mit Siomycin A *in vivo* erprobt und die Möglichkeiten einer Entfernung von FoxM1 aus dem Tumor mittels RNAi-Technologie untersucht.

Kapitel 2

Material und Methoden

2.1 Primersequenzen

Alle Primer wurden mit dem öffentlich verfügbaren Programm Primer-BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>, National Center for Biotechnology Information, Bethesda, MD, USA) kreiert und von Eurofins MWG GmbH (Ebersberg) bezogen. Die Sequenzen zeigt Tabelle 2.1.

Tabelle 2.1: Sequenzen der verwendeten Primer.

Primername	Sequenz 5' - 3'
mFoxm1 Fw	TGGCTTCCCAGCAGTACAAATC
mFoxm1 Rv1	GTAAGGCCACCTTGTCTCA
mFoxm1 Rv2	TCTCGCTCAATTCCAAGACCAG
mSmo Fw	GGAGCGGGAGAAATGGATATG
mSmo Rv	CGTGATCTGCAACTCCAGTC
mSmoM2 Fw	GAACGGCATCAAGGTGAA
mSmoM2 Rv	CGATGGGGGTGTTCTGCT
RTmB2MG Fw	CCTGGTCTTTCTGGTGCTTG
RTmB2MG Rv	TATGTTTCGGCTTCCCATTCT
RTmFoxm1 Fw	GGACATCTACACTTGGATTGAGG
RTmFoxm1 Rv	GATTGGGTCGTTTCTGCTGT
RTmSfrp1 Fw	ACCCCGCCCAATACCACGGA
RTmSfrp1 Rv	TCCTCAGTGCAAACCTCGCTTGCA
RTmAxin2 Fw	GCTGGTTGTCACCTACTTTTTCT
RTmAxin2 Rv	ATTCGTCACTCGCCTTCTTG
RTmDkk1 Fw	CTGACCACAGCCATTTTCCT
RTmDkk1 Rv	ACGGAGCCTTCTTGTCCTTT

2.2 Humane Proben

2.2.1 Eigene Kohorte

Die humane Kohorte umfasste 43 formalinfixierte, in Paraffin eingebettete (FFPE) Biopsieproben. Insgesamt waren 21 männliche (48.8%) und 22 weibliche Patienten (51.2%) in der Studie vertreten. Alle Patienten wurden in den Universitätskliniken von München, Göttingen, Bremen, Hannover und Münster behandelt. Das mittlere Alter betrug 9.3 Jahre (0.6 - 45.6 Jahre). Die mittlere Überlebensdauer belief sich auf 53.0 Monate (22.2 - 175.6 Monate). Zum 1. Januar 2011 waren 16 Patienten verstorben. Histologische Klassifizierung der Medulloblastome ergab einen anaplastischen Typ, 25 klassische Tumore, 14 desmoplastische und zwei extensiv-noduläre Medulloblastome. Ein Tumor wurde histologisch nicht klassifiziert. Die Diagnose wurde an Hämatoxylin/Eosinfärbungen und Silberfärbungen von Schnitten durch mindestens zwei Neuropathologen gemäß der neuesten Richtlinie zur Klassifikation von Hirntumoren der *World Health Organisation* (WHO) gesichert (Louis et al., 2007). Eine detaillierte Auflistung der humanen Tumoren befindet sich in Anhang A.1.

2.2.2 Microarraydaten humaner Medulloblastome

Expressionsdaten und klinische Parameter von 193 humanen Medulloblastomen wurde von Cho et al. (2010) zur Verfügung gestellt und mit „PASW statistics 18“ (IBM, USA) prozessiert.

2.3 Arbeiten mit eukaryotischen Zellen

Die Arbeit mit eukaryotischen Zellen erfolgte mit sterilen Gefäßen und Lösungen in einer sterilen Umgebung (HERAsafe®, Thermo). Die Experimente fanden, soweit nicht anders angegeben, bei Raumtemperatur statt. Zellen wurden bei $-130\text{ }^{\circ}\text{C}$ in flüssigem Stickstoff kryokonserviert und nach spätestens 20 Passagen neu aufgetaut.

2.3.1 Humane Medulloblastomzelllinien

Die verwendeten D425med Zellen wurden freundlicherweise von Dr. Darell Bigner (Duke University Medical Center, Durham, NC, USA), R300 und UW228 von Dr. Michael S. Bobola (Children's Hospital and Regional Medical Center, Seattle, WA, USA) zur Verfügung gestellt. AZ521, DAOY und HEK293T wurden von der *American Type Culture Collection* (ATCC) bezogen. Alle Zelllinien wurden in 75 cm BD FalconTM-Zellkulturflaschen im Brutschrank bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ und 5% CO_2 gezüchtet. Die Zellen wurden regelmäßig im Mikroskop kontrolliert und bei Bedarf in einem Verhältnis von 1:10 in frisches Kulturmedium (DMEM Medium, 10 % fötales Kälberserum, 1 % Glutamax) gesplittet.

2.3.2 Transfektion

Die Transfektion der Zellen wurden mit dem NanoJuiceTM Transfection Reagent Kit (Merck, Darmstadt) nach Herstellerangaben durchgeführt. Transfection Core Reagent und Transfektion Booster wurden in Opti-MEMTM (Invitrogen, Darmstadt) gemischt und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde das Plasmid zugegeben und nach weiteren 15 min tropfenweise auf die Zellen gegeben.

2.3.3 Produktion lentiviraler Partikel

Lentivirale Partikel zur Transduktion von Medulloblastomzelllinien wurden durch Transfektion von HEK293T-Zellen produziert. Hierfür wurden Helferplasmide (pCMV-VsVg und pCMV-gag-pol) zusammen mit Plasmiden verwendet, die auf dem pLKO.1 backbone basieren und vom Broad Institute of Harvard und dem MIT (Cambridge, MA, USA) bezogen wurden. Die verwendeten Sequenzen waren folgende: CCGCAGGTATGCACGCGT (Kontrollsequenz, Mock Virus), GCACTATCAACAATAGCCTAT (shRNA#1), GCCAATCGT-TCTCTGACAGAA (shRNA#2). 48 h nach Transfektion wurde der Überstand geerntet, mit einem RotilaboTM-Spritzenfilter (Roth, Karlsruhe) sterilfiltriert, aliquotiert und bis zur Verwendung bei -80°C gelagert.

2.3.4 Infektion mit Lentiviren

Zelllinien wurden über Nacht mit Virus infiziert und mit $2\text{ }\mu\text{g/ml}$ Puromycin (Invitrogen, Karlsruhe) selektioniert. Zellen mit erfolgreich integrierter shRNA-Sequenz wiesen eine Puromycinresistenz auf und konnten nach 48 h geerntet werden.

2.3.5 Bestimmung der Zellviabilität

Die Zellviabilität wurde mit dem 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT) Test bestimmt. Hierfür wurden $100\text{ }\mu\text{l}$ Zellsuspension in 96well Platten (Thermo Electron LED GmbH, Langenselbold) ausgesät und für 4 h mit $10\text{ }\mu\text{l}$ MTT-Lösung (5 mg/ml in PBS) inkubiert. Das gebildete, wasserunlösliche Formazansalz wurde durch Zugabe von $100\text{ }\mu\text{l}$ Solubilisationslösung ($10\text{ }\%$ SDS in 0.01 M HCl) über Nacht bei 37°C gelöst und die Absorption bei 580 nm im Spektrophotometer gemessen.

2.3.6 Analyse des Spindelapparats

DAOY Zellen wurden stabil mit α -Tubulin-GFP transfiziert, in Glasbodenplatten (Mattek Corporation, Ashland, MA, USA) ausgesät und in einer Heizkammer bei 37°C und 5% CO_2 inkubiert. FoxM1 wurde mit siRNA oder Siomycin A inhibiert und nach 16 h wurde der Spindelapparat der lebenden Zellen mit einem konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop (Zeiss, Jena) visualisiert. Mitotische Zellen mit einer regulären, bipolaren Spindel wurden als „normal“ definiert. Mitotische Zellen mit mehr als zwei Spindelpolen wurden der Gruppe der abnormen Zellen zugeordnet.

2.4 Molekularbiologische Methoden

2.4.1 Isolation von mRNA

Gesamt-RNA wurde nach Chomczynski (1993) aus Zellen isoliert. Hierfür wurde das gewaschene Zellpellet in 750 µl TRIzol® (Invitrogen, Karlsruhe) homogenisiert und bei Raumtemperatur 5 min inkubiert. Nach Zugabe von 150 µl Chloroform wurde die Probe 15 s geschüttelt und anschließend 3 min inkubiert. Das Gemisch wurde bei 4 °C und 16100 g 15 min zentrifugiert und der klare Überstand in ein neues, mit 375 µl Isopropanol gefülltes Eppendorfcup überführt. Nach einer Inkubationszeit von 10 min bei Raumtemperatur wurde die RNA bei 4 °C und 16100 g 10 min abzentrifugiert. Das Pellet wurde mit 750 µl 75 % Ethanol gewaschen und die DNA mit dem RQ1 RNase-Free DNase Kit (Promega, Madison, WI, USA) nach Herstellerangaben verdaut. Die Reinheit der Probe und die Konzentration der RNA wurden mit dem NanoDrop™ (Fisher Scientific GmbH, Schwerte) bestimmt.

2.4.2 Generierung von cDNA

Die in Kapitel 2.4.1 isolierte mRNA wurde mit dem SuperScript® III First-Strand Synthesis SuperMix gemäß Herstellerangaben in cDNA umgeschrieben. Zur Verbesserung der Ausbeute wurden oligo(dT)₂₀-Primer zusammen mit *random hexamer*-Primern zur Synthese verwendet.

2.4.3 Relative Quantifizierung mittels qRT-PCR

Mit der isolierten cDNA aus Kapitel 2.4.2 wurde die Expression der Zielgene durch relative Quantifizierung bestimmt. Hierfür wurde das LightCycler® 480-System mit dem LightCycler® 480 SYBR Green I Master (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim) verwendet. Die Experimente wurden nach Herstellerangaben in 10 µl Triplikaten durchgeführt. Das verwendete Laufprotokoll zeigt Tabelle 2.2.

Tabelle 2.2: PCR-Programm für die relative Quantifizierung.

Schritt #	Detektionsmodus	Temperatur °C	Zeit s	
Vorinkubation		95	300	
Amplifikation	„Single“	95	10	50 Zyklen
		60	10	
		72	20	
Schmelzkurvenanalyse	„Continuous“	95	5	
		65	60	
		97		
Kühlen		40	∞	

2.4.4 Isolation von Gesamtprotein aus Zellpellets

Die Zellen wurden 5 min bei 300 g abzentrifugiert, das Pellet einmal mit PBS Puffer gewaschen und erneut abzentrifugiert. Das PBS wurde abgenommen und das Pellet sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Zellen wurden in 50 µl eiskalten Zellysepuffer (25 mM Tris, 50 mM NaCl, 0.5 % Natriumdeoxycholate, 0.5 % Triton X-100, Protease Inhibitor Cocktail Complete®) resuspendiert und für 30 min bei 4 °C auf einem Thermomixer comfort (Eppendorf, Hamburg) geschüttelt. Die Proben wurden dann bei 16100 g bei 4 °C zentrifugiert und der Überstand in ein neues, vorgekühltes Eppendorfcup überführt.

2.4.5 Bestimmung der Proteinkonzentration

Zur Konzentrationsbestimmung des isolierten Gesamtproteins kam die BCA-Methode zur Anwendung. Hierfür wurden Bicinchoninsäure und 4 % (*w/v*) CuSO₄ im Verhältnis 50:1 gemischt. 140 µl des Gemisches wurde in einem 96well mit 10 µl Proteinlösung versetzt und 30 min bei 37 °C inkubiert. Die Absorption des entstehenden violetten Farbstoffes wurde bei einer Wellenlänge von 562 nm photometrisch erfasst und in Relation zu der Absorption einer bovinen Serumalbumin (BSA)-Standardreihe gesetzt.

2.4.6 SDS-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die SDS-Gelelektrophorese dient der Auftrennung von Proteinen hinsichtlich ihrer Masse im elektrischen Feld. Durch die Bindung von SDS an die Proteine entstehen negativ geladene Protein-SDS-Komplexe mit einem konstanten Ladungs-Masse-Verhältnis. Im elektrischen Feld wandern die Komplexe zum positiv geladenen Pol und werden durch den Molekularsiebeffekt in der Polyacrylamidmatrix nach ihrer Molekularmasse getrennt (Laemmli, 1970).

In dieser Arbeit wurden je nach dem gewünschten Trennbereich Trenngele verwendet, die zwischen 10 % und 15 % Acrylamid enthielten. In Tabelle 2.3 ist die Zusammensetzung der verwendeten Gele aufgeführt. 25 µg Gesamtprotein wurden mit 5-fach konzentrierten Probenpuffer versetzt und für 10 min auf 95 °C erhitzt. Die Elektrophorese lief in Laufpuffer bei 20 bis 40 mA pro Gel und war nach 50 bis 60 min beendet. Zum Nachweis der aufgetragenen Proteine wurden die Gele durch Behandlung mit Coomassie Brilliant Blau gefärbt (Fairbanks et al., 1971). Dazu wurde das Gel für 30 min mit PAGE-Färber (45 % (*v/v*) Methanol, 10 % (*v/v*) Essigsäure, 0.25 % (*w/v*) Coomassie Brillant Blau R250) gefärbt und anschließend in Entfärber (45 % (*v/v*) Methanol, 10 % (*v/v*) Essigsäure) geschüttelt. Der Entfärber wurde mehrmals gewechselt und das Entfärben gestoppt, sobald der Hintergrund des Gels klar wurde und die Proteinbanden auf dem Gel deutlich sichtbar wurden. Die theoretische Nachweisgrenze dieser Methode liegt bei 100 ng Protein pro Proteinbande.

Tabelle 2.3: Zusammensetzung der SDS-Gele.

Chemikalie	SDS-Gel		
	10 %	12.5 %	15 %
Acrylamid-Bis 30 % [ml]	6.6	8.3	10
Runninggelpuffer [ml]	5.0	5.0	5.0
SDS-Lösung 10 % [ml]	0.2	0.2	0.2
ddH ₂ O [ml]	8.1	7.4	4.7
TEMED [ml]	0.01	0.01	0.01
APS-Lösung 10 % [ml]	0.15	0.15	0.15

2.4.7 Spezifischer Nachweis von Protein durch Western Blot

Für den Western Blot werden Proteine zuerst durch SDS-PAGE nach Kapitel 2.4.6 aufgetrennt, elektrophoretisch auf eine Membran übertragen und dort mit einem spezifischen Antikörper inkubiert. Die anschließende Behandlung mit einem sekundären Antikörper, der eine alkalische Phosphataseaktivität besitzt, macht die transferierten Proteine sichtbar (Schüller et al., 2007).

Das Gel wurde auf eine mit TBE-Puffer äquilibrierte Immobilon®-P PVDF Membran (Millipore, Billerica, MA, USA) gelegt und dieser Komplex zwischen in Westernblotpuffer getränkten Whatmanfilterpapierstreifen platziert. Der Transfer der Proteine auf die Membran erfolgte in einer Semi-Dry Transfer-Apparatur (Hoefer, Holliston, MA, USA) für 150 min bei einer konstanten Stromstärke von 60 mA. Die Membran wurde anschließend in 2 %iger (*w/v*) Ponceau-Lösung (0.2 g Ponceau-S, 3 g Trichloressigsäure, 3 g Sulfosalicylsäure, ad 100 ml H₂O) gefärbt, der mitgeführte Molekularmassenmarker für einen späteren visuellen Größenvergleich gekennzeichnet und anschließend durch Waschen mit TPBS wieder entfärbt. Die folgende einstündige Inkubation in TPBS-Puffer mit 5 % (*w/v*) Magermilchpulver bei Raumtemperatur ermöglichte die Absättigung der noch freien Proteinbindungsstellen. Es folgten drei Waschschritte mit TPBS für je 5 min. Anschließend wurde die Membran über Nacht bei 4 °C mit dem primären Antikörper (β -Aktin 1:2000, Sigma Aldrich, Hamburg; Cleaved Caspase-3 (Asp175) 1:500, New England Biolabs GmbH, Frankfurt(Main); CyclinB1 1:200, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA; FoxM1 1:200, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA; β -Tubulin 1:2000, Sigma Aldrich, Hamburg) geschüttelt. Am nächsten Tag wurde der Blot dreimal mit TPBS für je 5 min gewaschen. Der Blot wurde mit dem sekundären Antikörper (Goat Anti-Mouse IgG (H+L) 1:5000, Jackson ImmunoResearch Europe Ltd., Suffolk, United Kingdom; Goat Anti-Rabbit IgG 1:2000, Dako Deutschland GmbH, Hamburg) 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dreimaligen Waschen mit TPBS für je 5 min folgte die Entwicklung mit CDP-Star, ready-to-use (Roche Applied Science, Mannheim) und ChemoCam Imager (Intas Science Imaging Instruments GmbH, Göttingen). Bandenintensitäten wurden mit dem Programm ImageJ (NIH, USA) bestimmt.

2.5 Histologische Methoden

2.5.1 Immunohistochemie

FFPE Proben wurden in die erforderliche Dicke geschnitten, deparaffiniert und rehydriert. Antigendemaskierung wurde durch mehrmaliges Kochen in Citratpuffer (HIER) erreicht. Nach Inkubation über Nacht bei 4 °C mit Primärantikörper gegen FoxM1 (1:25, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) wurde der Schnitt mit dem EnVisionTM + System-HRP (DAB)-Kit (Dako Deutschland GmbH, Hamburg) gemäß den Herstellerangaben entwickelt. Anschließend erfolgte eine Kernfärbung mit Hämalaun als Gegenfärbung.

2.5.2 Immunofluoreszenzfärbung

Schnitte und fixierte Medulloblastomzellen wurden zweimal mit 0.1 % TritonX-100 in PBS gewaschen und 30 min bei Raumtemperatur mit I-BlockTM Protein-Based Blocking Reagent (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA) geblockt. Primärantikörper (FoxM1 1:25, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA; Ki67 1:500, Dako Deutschland GmbH, Hamburg; CyclinB1 1:200, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) wurden in Blockingpuffer verdünnt und über Nacht bei 4 °C verwendet. Ungebundener Antikörper wurde durch zweimaliges Waschen mit 0.1 % TritonX-100 in PBS entfernt. Sekundärantikörper (Alexa Fluor[®]-488 und Alexa Fluor[®]-543, Invitrogen, Karlsruhe) wurden in einer Verdünnung von 1:500 in Blockingpuffer für 30 min auf der Probe belassen und anschließend überschüssiger Antikörper durch zweimaliges Waschen mit 0.1 % TritonX-100 in PBS entfernt. Zellkerne wurden mit 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) gegengefärbt. Fluoreszenzbilder von humanen Medulloblastomtumoren wurden mit einem Olympus IX50-Mikroskop aufgenommen, Bilder von Zellkulturexperimenten an einem konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop (Zeiss, Jena).

2.6 Tierexperimentelle Arbeiten

Alle durchgeführten Tierversuche erfolgten nach den Vorgaben des geltenden Tierschutzgesetzes und wurden durch die Regierung von Oberbayern (Genehmigungsnummer: AZ 55.2-1-54-2531-41-07) genehmigt. Die Mäuse wurden in geschlossenen Käfigsystemen (*Individually Ventilated Cage* (IVC)) bei einem konstanten Licht-Dunkel-Rhythmus von 12/12 Stunden mit Wasser und Futter *ad libitum* gehalten. Zur Entnahme des Gehirns wurden adulte Tiere durch zervikale Dislokation getötet. Alle unter zwei Wochen alte Tiere wurden durch Dekapitierung getötet.

2.6.1 Genotypisierung der verwendeten Mauslinien

2.6.1.1 Isolation genomischer DNA aus Mausschwanzbiopsien

Für die Bestimmung des Genotyps der verwendeten Mauslinien wurde an P3 der Maus ein 0.1 – 0.3 cm langes Gewebestück an der Schwanzspitze entnommen. Dieses wurde mit 500 µl Lysepuffer (200 mM NaCl, 100 mM Tris-HCl pH 8.3, 5 mM EDTA, 0.2 % SDS, 200 µg/ml Proteinase K in ddH₂O) versetzt und über Nacht bei 56 °C im Thermoschüttler (750 rpm) verdaut. Dann wurde die Probe bei Raumtemperatur bei 16100 g 5 min zentrifugiert und der Überstand in ein neues, 500 µl Isopropanol enthaltendes Eppendorfcup überführt. Nach mehrmaligem Schütteln wurde die Probe erneut bei Raumtemperatur bei 16100 g 5 min zentrifugiert und das Pellet in 100 µl TE-Puffer (20 µM Tris-HCl pH 8.3, 1 mM EDTA in ddH₂O) gelöst.

2.6.1.2 Polymerasekettenreaktion (PCR) zum Nachweis des Genotyps

Genomische DNA, die aus Mausschwanzbiopsien gewonnen wurde (siehe 2.6.1.1), diente als Ausgangsmaterial für die Genotypenbestimmung. Verwendete Primerpaare sind in Tabelle 2.4 aufgeführt; die Produkte wurden in einem TPersonal 48 Thermocycler (Biometra GmbH, Göttingen) nach Tabelle 2.5 amplifiziert.

Tabelle 2.4: Primer für die Genotypisierung der verwendeten transgenen Mäuse.

Primernamen	amplifiziertes Produkt	
	wildtype	gefloxt
mFoxm1 Fw	284	318
mFoxm1 Rv		
mSmo Fw	410	-
mSmo Rv		
mSmoM2 Fw	-	109
mSmoM2 Rv		

Tabelle 2.5: PCR-Programm für die Genotypisierung transgener Mäuse.

Schritt #	Temperatur °C	Zeit s	32 Zyklen
1	92	120	
2	92	30	
3	55	30	
4	72	60	

Schritt #	Temperatur °C	Zeit s
5	72	180
6	4	∞

Die Analyse der Fragmente erfolgte auf 2 % -igen Agarosegelen und mit einem Syngene Geldokumentationssystem (Synoptics Limited, Cambridge, United Kingdom).

2.6.2 Primärzellkultur

Math1-cre::SmoM2^{Fl/+}Foxm1^{Fl/+} bzw. *Math1-cre::SmoM2^{Fl/+}Foxm1^{Fl/Fl}*-Mäuse wurden an P5 dekapitiert und das Gehirn vorsichtig freigelegt. Das Cerebellum wurde aseptisch vom Hirnstamm getrennt und in 10 ml Hirnpuffer (Hanks buffered saline solution (HBSS), 6 mg/l Glukose) gewaschen. Das Pellet wurde in 1 ml Tumorlysepuffer (Trypsin-EDTA (Sigma Aldrich, Hamburg), 100 µg/ml DNase I) resuspendiert und bei 37 °C 10 min lysiert. Das Pellet wurde zweimal mit Hirnpuffer gewaschen und anschließend in Tumormedium (DMEM-F12, 10 % fötales Kälberserum, 1 % N2 supplement, 1 % Penicillin/Streptomycin, 0.25 mM KCl) ausgesät. Nach 6 h wurde das Tumormedium abgenommen und durch Shh-Tumormedium (DMEM-F12, 1 % N2 supplement, 1 % Penicillin/Streptomycin, 0.25 mM KCl, 3 µg/ml *Sonic hedgehog* Protein) ersetzt. Nach 24 h wurden die Zellen für 2 h mit lentiviralen Partikeln infiziert und weitere 24 h in Shh-Tumormedium kultiviert. Die Zellen wurden mit 25 µg/ml Bromdesoxyuridin (BrdU) gepulst und mit 4 % Paraformaldehyd (PFA) fixiert.

2.6.3 Injektion von lentiviralen Partikeln

Math1-cre::SmoM2^{Fl/+}-Mäuse wurden an P14 mit einer *intraperitonealen* Injektion (39 µl Rampun 2%, 39 µl Ketamin 10%, 17 µl Vetranquil 1%, 210 µl NaCl) anästhesiert. Der Schädelknochen wurde vorsichtig freipräpariert und das Bregma lokalisiert. 0.2 mm kaudal zum Bregma und 1.0 mm lateral zur Mittellinie wurde ein Loch gebohrt und mit einer 5 µl Hamiltonspritze (Hamilton, Reno, NV, USA) in einer Tiefe von 2.25 µm ein Gesamtvolumen von 3 µl Lentiviren (hergestellt nach Kapitel 2.3.3) über einen Zeitraum von 5 min langsam injiziert. Die Wunde wurde mit einer Senknaht vernäht und die Tiere nach Wiedererwachen aus der Narkose zur Mutter zurückgesetzt.

2.6.4 Subkutane Injektion von Tumorzellen

Die *in vitro* als Monolayer wachsenden humanen Medulloblastomtumorzellen wurden trypanisiert und mit PBS gewaschen. Die Bestimmung der Zellkonzentration und Zellvitalität wurde mit Hilfe einer Neubauerzählkammer und dem Trypanblau-Exklusionstest durchgeführt. 10⁶ Zellen wurden in 400 µl sterilem PBS resuspendiert und mit 100 µl MatrigelTM Basement Membrane Matrix (BD Biosciences, Heidelberg) versetzt. Die Injektion erfolgte mit einer 26G-Nadel in thymusaplastische Nacktmäuse (NMRI nu/nu). Mit der Nadel

wurde nach Desinfektion der Einstichstelle mit Cutasept®F (Bode Chemie, Hamburg) am höchsten Punkt des Rückens über der Wirbelsäule die Haut durchstoßen. Anschließend wurde die Nadel 1.5 cm nach ventral in Richtung Schulterblatt vorgeschoben und die Zellsuspension abgesetzt. Die Größe der Tumoren wurde mit Hilfe einer Schieblehre alle drei Tage gemessen und das Volumen mit folgender Formel berechnet:

$$\text{Volumen [mm}^3\text{]} = \text{Breite [mm]} * \text{Breite [mm]} * \text{Länge [mm]} * 0.52$$

Die Behandlung der Tumoren erfolgte in einem zweitägigen Rhythmus. Als Kontrolle wurde ein Gemisch aus 10 % Tween 80, 20 % N,N-Dimethylacetamid und 70 % Polyethylenglykol 400 (alle Sigma Aldrich, Hamburg) verwendet. Siomycin A wurde in der Kontrollsubstanz gelöst, sterilfiltriert und in einer Dosis von 50 mg/kg verwendet. Beide Lösungen wurden *intraperitoneal* injiziert.

2.7 Statistische Analysen

Expressionsdaten und Ergebnisse der Zellviabilitätsversuche wurden mit dem Mann-Whitney-U-Test statistisch ausgewertet. Zur Berechnung der Fraktionen FoxM1- und Ki67-positiver Tumorzellen wurden mindestens 500 Tumorzellen ausgezählt. Korrelationen wurden nach Spearman bestimmt. Statistische Unterschiede des Anteils abnormaler Spindeln wurden mit dem Fisher-Exact-Test berechnet. Überlebenszeitanalysen wurden mit der Kaplan-Meier-Methode durchgeführt und statistisch mit dem Log-Rank-Test untersucht. Prognostische Marker in der multivariaten Analyse wurde mit der Cox-Regression statistisch bestimmt. Bei allen Tests wurden p-Werte kleiner als 0.05 als statistisch signifikant betrachtet. Als statistische Software wurde Prism 5.02 (Graphpad, USA) und PASW statistics 18 (IBM, USA) verwendet.

Kapitel 3

Ergebnisse

3.1 Expressionsprofil von FoxM1 im humanen Medulloblastom

Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe konnten zeigen, dass FoxM1 in murinen cerebellären Gewebe stark exprimiert wird (Schüller et al., 2007). FoxM1 wird von Körnervorläuferzellen während der Entwicklung des Kleinhirns sowie von Medulloblastomen von *ptch*^{+/-}-Mäusen exprimiert. Im adulten Kleinhirn der Maus kann eine Expression von FoxM1 nicht nachgewiesen werden.

Zur Analyse der Expression von humanen Medulloblastomen wurden Microarraydaten einer 2010 publizierten Patientenkohorte ausgewertet (Cho et al., 2010). Diese Kohorte umfasste 193 Medulloblastome, deren Expression von *FOXM1* in Abbildung 3.1A dargestellt ist. Die molekulare Einteilung der Medulloblastome wurde wie in der Publikation durchgeführt. Nach der 2012 neu eingeführten molekularen Einteilung von Medulloblastomen entspricht der molekulare Subtyp „c3“ der Originalpublikation dem Shh-Typ und „c6“ dem Wnt-Typ (Taylor et al., 2012). „c1“ und „c5“ werden zur Gruppe 3 sowie „c2“ und „c4“ zur Gruppe 4 zusammenfasst (Taylor et al., 2012).

Unabhängig vom molekularen Subtyp wurde *FOXM1* in allen 193 Medulloblastomen stark exprimiert ($p > 0.05$). Zu diesen Tumoren liegen zusätzlich noch klinische Parameter vor. Deswegen wurde das Expressionslevel von *FOXM1* der einzelnen histologischen Subtypen untersucht (Abbildung 3.1B). Klassische und nodular/desmoplastische Medulloblastome zeigten ein ähnliches Expressionsniveau von *FOXM1*, anaplastische Medulloblastome, die durch eine Amplifikation von *MYC* oder *MYCN* und eine schlechtere Überlebensprognose charakterisiert sind (von Hoff et al., 2010), exprimierten signifikant mehr *FOXM1* als die anderen Subtypen ($p < 0.001$). Der Nachweis von FoxM1 auf zellulärer Ebene erfolgte mit einem α -FoxM1-Antikörper auf formalinfixiertem und in Paraffin eingebetteten Tumormaterial. Die Stichprobe umfasste 43 Medulloblastomfälle, deren histologische Charakteristika und klinische Parameter im Anhang A.1 aufgeführt sind. FoxM1 konnte in allen 43 analysierten Medulloblastomen nachgewiesen werden und war auf den Nucleus der Tumorzelle beschränkt (Abbildung 3.1C). Der Median der FoxM1⁺ Tumorzellen lag bei

6.95 %, bei einem minimalen Anteil von 2.44 % und einem maximalen Anteil von 30.7 % (Abbildung 3.1D). Wie aus Abbildung 3.1C ersichtlich, war die Expression von FoxM1 in desmoplastischen Medulloblastomen hauptsächlich auf den Internodularraum des Tumors beschränkt. Dieser Bereich ist hoch proliferativ. Nodule dagegen sind höher differenziert und zeigten weniger FoxM1 Expression.

Proliferierende Zellen exprimieren in allen Phasen des Zellzyklus außer G₀ Ki67, das somit als spezifischer Marker für alle proliferierende Zellen verwendet werden kann (Gerdes, 1990). Daher wurde als nächstes untersucht, ob FoxM1 nur in Ki67⁺ und somit proliferierenden Tumorzellen nachweisbar ist. Doppelimmunfluoreszenzfärbungen konnten zeigen, dass FoxM1 sowohl von proliferierenden Ki67⁺-, als auch von Ki67⁻-Tumorzellen exprimiert wird (Abbildung 3.1E). Ebenso korrelierten der Anteil der FoxM1⁺-Tumorzellen nicht mit dem Anteil der Ki67⁺-Tumorzellen ($n=43$, $r_s=0.254$, $p>0.05$, Abbildung 3.1F).

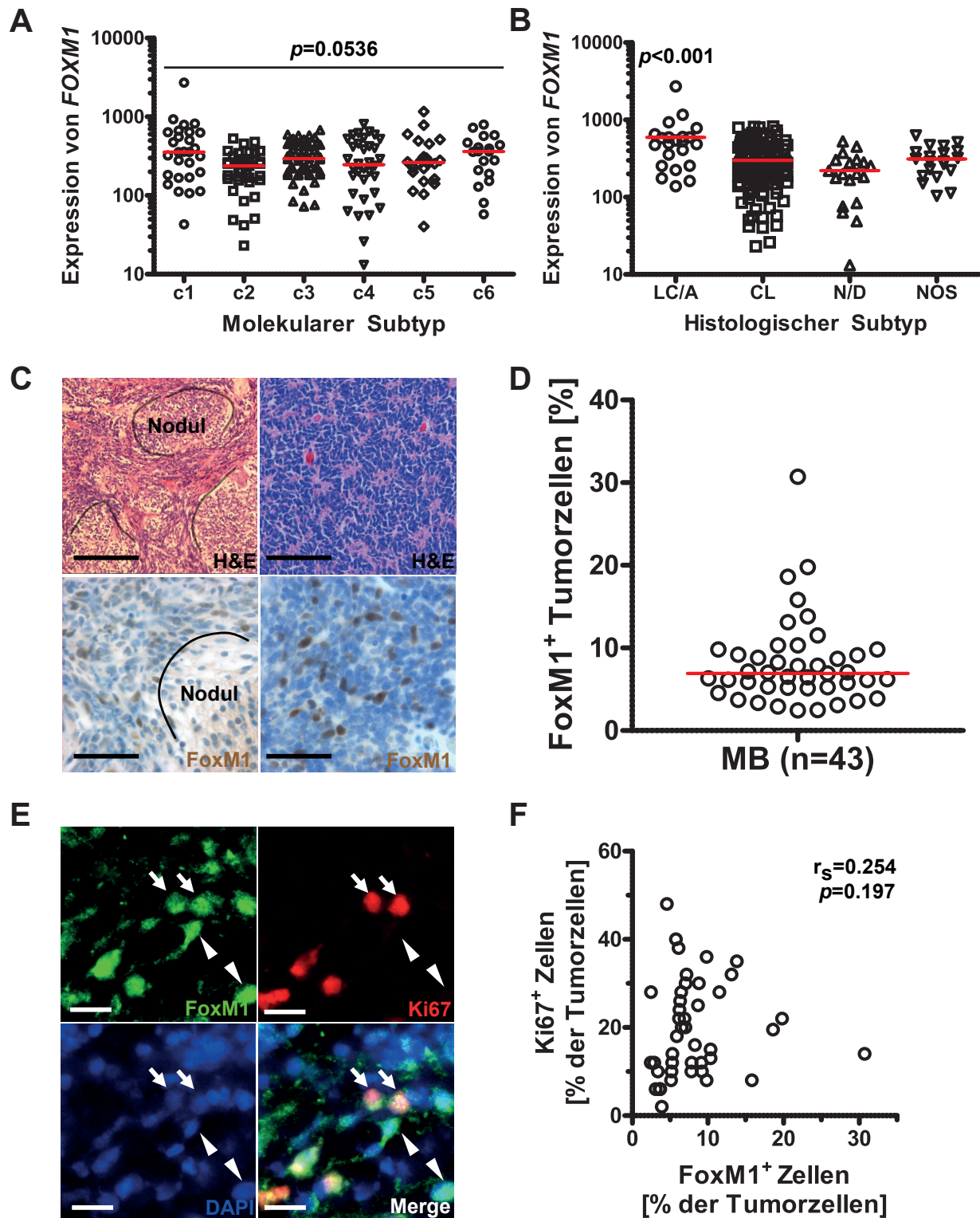
Weder in der Microarraypatientenkohorte (Abbildung B.1A), noch in der FFPE-Gruppe (Abbildung B.1B) korrelierte die Expression von FoxM1 mit dem Alter (alle $p>0.05$). Analog zu den Ergebnissen der Microarraygruppe bestand kein signifikanter Unterschied in der FoxM1-Expression zwischen Medulloblastomen des klassischen Subtyps und des nodular/desmoplastischen Subtyps (Abbildung B.1C, $p>0.05$).

3.2 FoxM1 als prognostischer Marker

3.2.1 FoxM1 als histologischer prognostischer Marker

Als nächster Schritt wurde ein möglicher Zusammenhang zwischen dem Expressionsniveau von FoxM1 in humanen Medulloblastomen und dem Überleben des Patienten untersucht. Dazu wurde die Kaplan-Meier-Methode benutzt (Kaplan and Meier, 1958). Klinische Daten waren für 41 Patienten verfügbar. Der Median der FoxM1 Expression (7.02 %) wurde als Grenze verwendet, um zwei gleich große Gruppen zu bilden. Es wurden die Medulloblastome, deren Anteil FoxM1⁺-Tumorzellen kleiner als der Median war, zu einer Gruppe zusammengefasst und eine zweite Gruppe mit hoher FoxM1-Expression gebildet. Die Prognose der Patienten mit einem hohen Anteil von FoxM1-exprimierenden Tumorzellen ($n=20$) war signifikant schlechter als die der Patienten mit einem niedrigen Anteil ($n=20$, $p<0.001$, Abbildung 3.2.1A). Die Fünfjahresüberlebensrate betrug in der FoxM1_{niedrig}-Gruppe 84.8 % und in der FoxM1_{hoch}-Gruppe 42.8 %.

Zur Bestätigung der Ergebnisse wurde die unabhängige Kohorte von Cho et al. (2010) verwendet. Hierbei lagen für 130 Medulloblastompatienten neben den Expressionsdaten von *FOXM1* auch die jeweilige Überlebenszeit vor. Die Kohorte wurde in zwei Gruppen aufgeteilt. Als cut-off wurde die Grenze gewählt, bei der der kleinste p -Wert berechnet werden konnte. Der p -Wert wurde mit dem Log-Rank-Test (Kalbfleisch and Prentice, 1980) berechnet. Abbildung 3.2.1B zeigt den kleinsten berechneten p -Wert. Patienten mit Tumoren, die in hohem Maße *FOXM1* exprimierten ($n=44$) hatten eine signifikant niedrigere Überlebenswahrscheinlichkeit als Patienten mit Tumoren, die wenig *FOXM1* exprimierten ($n=86$, $p=0.0055$).



3.2.2 Multivariatenanalyse von Microarraydaten

Die Microarraykohorte wurde ursprünglich dazu benutzt Medulloblastome anhand ihres Expressionsprofil in molekulare Subtypen einzuteilen (Cho et al., 2010). Ein Subtyp mit schlechter Prognose, der „c1“ Subtyp, zeichnet sich durch eine vermehrte Kopienzahl des *MYC*-Gens, eine Aktivierung des Photorezeptor-Signalwegs sowie eine vermehrte Expression von miR-183-96-182 aus. Außerdem finden sich in der Literatur weitere Marker für eine schlechte Prognose bei Medulloblastom: anaplastische Histologie (von Hoff et al., 2010) und das Auftreten von Metastasen (Gilbertson, 2004). Eine univariate Analyse der Kohorte führte zu dem Ergebnis, dass neben dem Marker „c1“ (*Hazard ratio* 2.96, 95 %-Konfidenzintervall 1.30-6.70, $p=0.009$) und LC/A Histologie (*Hazard ratio* 3.0, 95 %-Konfidenzintervall 1.32-6.78, $p=0.008$) eine hohe Expression von *FOXM1* (*Hazard ratio* 2.67, 95 %-Konfidenzintervall 1.30-5.49, $p=0.008$) eine signifikant schlechtere Prognose für den Patienten bedeutet (Tabelle 3.1A). Das Vorliegen von Metastasen hatte dagegen keinen signifikanten Einfluß auf die Prognose (*Hazard ratio* 1.73, 95 %-Konfidenzintervall 0.70-4.26, $p=0.235$). Einen positiven Einfluß auf die Prognose bei einem Medulloblastom hat eine Aktivierung des Wnt-Signalwegs (Northcott et al., 2011b). Daher wurde das vorliegende Datenset auf einen möglichen Einfluß hin untersucht. Die Aktivierung des Wnt-Signalwegs (*Hazard ratio* 0.35, 95 %-Konfidenzintervall 0.05-2.54, $p=0.295$) hatte hierbei keinen signifikanten Einfluss auf das Überleben des Patienten.

Obwohl das Vorliegen von Metastasen oder eine Aktivierung des Wnt-Signalwegs in der univariaten Analyse keinen signifikanten Effekt auf das Überleben hatten, wurden sie in die multivariate Analyse des Datensets miteingeschlossen (Tabelle 3.1B). Mit Hilfe des Cox'schen Regressionsmodells wurde der prognostische Wert in Kombination mit allen anderen Prognoseparametern berechnet (Kalbfleisch and Prentice, 1980). Hier zeigte sich, dass in dieser Patientenkohorte die Expression von *FOXM1* der einzige untersuchte Marker ist, der einen signifikanten Effekt auf das Überleben des Patienten hatte (*Hazard ratio* 2.24, 95 %-Konfidenzintervall 1.05-4.77, $p=0.037$).

Abbildung 3.1 (vorhergehende Seite): **Expressionsprofil von FoxM1 im humanen Medulloblastom.** Die Analyse von Microarraydaten von 193 Medulloblastomtumorproben zeigte, dass FoxM1 in allen molekularen Subtypen stark exprimiert ist ((A)) und signifikant mehr *FOXM1* von anaplastischen Tumoren exprimiert wird ($p<0.05$, (B)). LC/A=anaplastisch, CL=klassisch, N/D=nodular/desmoplastisch, NOS=nicht näher spezifiziert. (C) H&E-Färbungen von einem desmoplastischen und einem klassischen Medulloblastom (oben links und oben rechts) und FoxM1-Proteinexpression (untere Reihe), Maßstab=500 μm (obere Reihe) und 100 μm (untere Reihe). (D) Quantifizierung der FoxM1⁺-Tumorzellen (n=43), roter Balken=Median. (E) Immunfluoreszenzbilder eines humanen Medulloblastoms zeigten die Expression von FoxM1 in Ki67⁺- (Pfeile) und Ki67⁻-Tumorzellen (Pfeilspitzen) (Maßstab=20 μm). (F) Der Anteil von FoxM1⁺ und Ki67⁺-Tumorzellen korrelierte in humanen Medulloblastomen nicht (n=43, $r_s=0.254$, $p=0.197$).

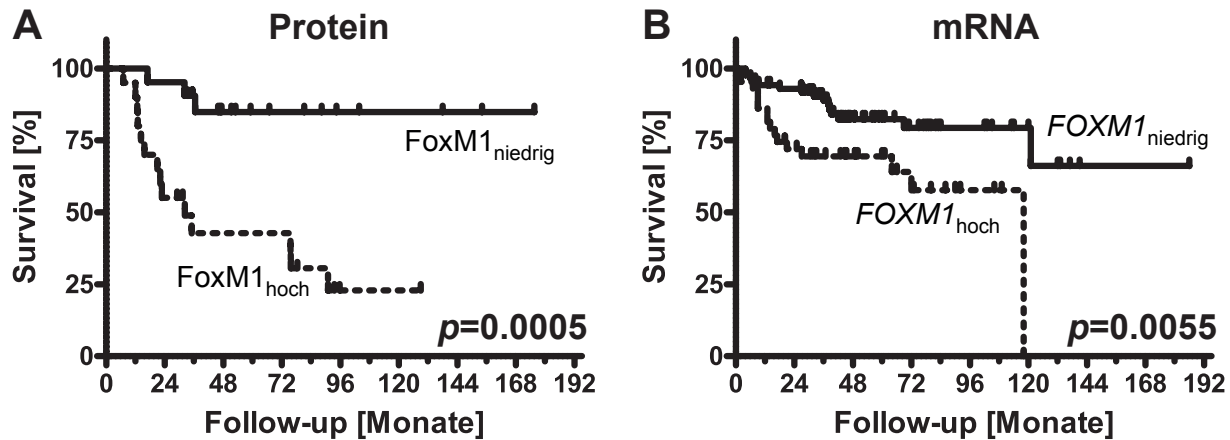


Abbildung 3.2: **Einfluss der FoxM1-Expression auf das Überleben bei Medulloblastom.** (A) Humane Medulloblastome wurden immunhistochemisch auf FoxM1 gefärbt und der Anteil der FoxM1⁺-Tumorzellen bestimmt (n=41). Die Patientenkohorte wurde durch den Median in zwei Fraktionen geteilt und das Überleben der zwei Gruppen (FoxM1_{hoch}, (n=20) und FoxM1_{niedrig}, (n=21)) mit der Kaplan-Meier-Methode berechnet. Patienten, deren Tumoren einen geringen Anteil von FoxM1⁺-Tumorzellen aufwiesen, überlebten signifikant länger als Patienten mit Tumoren mit einem hohen Anteil von FoxM1⁺-Tumorzellen ($p=0.0005$). (B) Überlebensanalyse einer unabhängigen Patientenkohorte (n=130), deren Expressionlevel von *FOXM1* durch Microarrays bestimmt wurde. Patienten wurden entsprechend der Expression von *FOXM1* dichotomisiert und das Überleben der zwei Gruppen mit dem Log-Rank-Test verglichen. Abgebildet ist der kleinste berechnete p -Wert. Hohe Expression von *FOXM1* (n=44) war mit einer schlechteren Überlebensprognose verbunden als niedrige Expression von *FOXM1* (n=86, $p=0.0055$).

Tabelle 3.1: Univariate Cox-Regression und multivariate Überlebensanalyse des Microarraydatensets.

Parameter	<i>Hazard ratio</i>	95 %-Konfidenzintervall	<i>p</i> -Wert
A. Univariate Analyse			
<i>FOXM1</i> _{hoch} -Expression	2.67	1.30-5.49	0.008
Referenz: <i>FOXM1</i> _{niedrig} -Expression			
LC/A Histologie	3.0	1.32-6.78	0.008
Referenz: alle anderen			
Molekulare Subgruppe MYC (c1)	2.96	1.30-6.70	0.009
Referenz: alle anderen			
Metastasenstatus M+	1.73	0.70-4.26	0.235
Referenz: M0			
Molekulare Subgruppe WNT (c6)	0.35	0.05-2.54	0.295
Referenz: alle anderen			
B. Multivariate Analyse			
<i>FOXM1</i> _{hoch} -Expression	2.24	1.05-4.77	0.037
Referenz: <i>FOXM1</i> _{niedrig} -Expression			
Molekulare Subgruppe MYC (c1)	2.07	0.89-4.83	0.093
Referenz: alle anderen			
Molekulare Subgruppe WNT (c6)	0.32	0.04-2.48	0.278
Referenz: alle anderen			
LC/A Histologie	1.56	0.63-3.86	0.332
Referenz: alle anderen			
Metastasenstatus M+	1.33	0.52-3.35	0.553
Referenz: M0			

3.3 Molekulare Untersuchungen zur zellulären Funktion von FoxM1 in Medulloblastomzelllinien

3.3.1 Expressionslevel von FoxM1 und Zusammenhang mit der Zellviabilität

Zur Aufklärung der zellulären Funktion von FoxM1 in Medulloblastomen wurden RNAi Experimente an vier permanenten Medulloblastomzelllinien (D425med, DAOY, R300 und UW228) durchgeführt, und nach Bestätigung des erfolgreichen Knock-downs wurde die resultierende Zellviabilität gemessen. Hierfür wurden die Zelllinien *in vitro* mit Lentiviren transduziert und stabile Klone selektioniert, die einen Knock-down für FoxM1 aufwiesen. RNAi-Sequenzen wurden anhand einer Datenbank des Broad Institute of Harvard ausgewählt (Yuan et al., 2004) und lentivirale Partikel in HEK293T Zellen hergestellt. Diese Partikel wurden benutzt, um humane Medulloblastomzelllinien zu infizieren und daraus

Rückschlüsse auf die zelluläre Funktion von FoxM1 in humanen Medulloblastomen ziehen zu können.

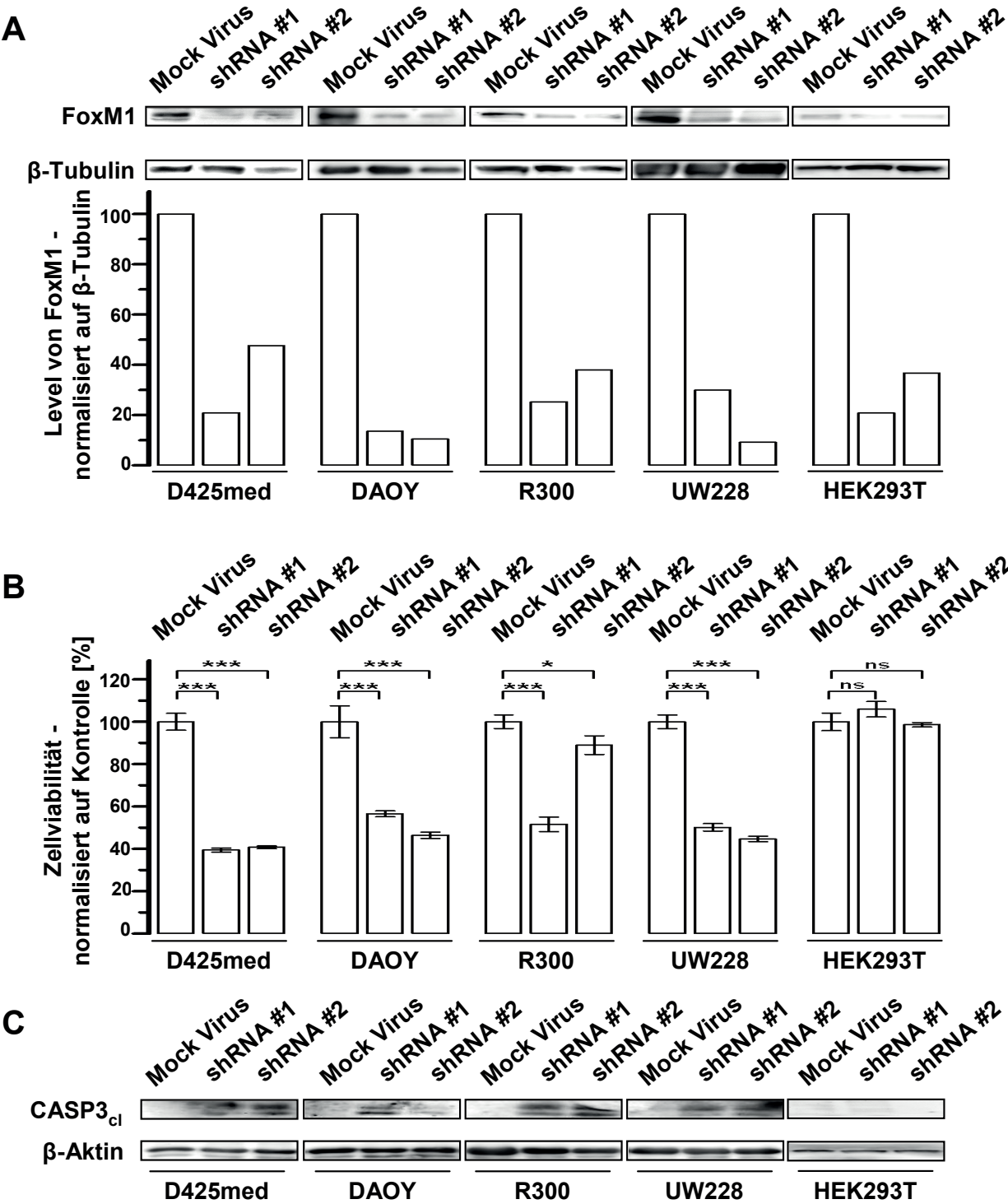
Alle vier Medulloblastomzelllinien, die mit einem Kontrollvirus (Mock Virus) infiziert wurden, exprimierten FoxM1 stark. In der Kontrollbedingung wurde ein Lentivirus verwendet, der für eine unspezifische RNAi-Sequenz kodiert (Abbildung 3.3A). HEK293T, eine stark proliferierende Zelllinie, exprimierte dagegen in der Kontrollbedingung FoxM1 nur schwach. Die Infektion der Zelllinien mit zwei verschiedenen Konstrukten, die beide spezifisch die Expression von FoxM1 inhibieren (shRNA #1 und shRNA #2) wurde verwendet, um die Bedeutung von FoxM1 für das Medulloblastom *in vitro* zu untersuchen.

Die Infektion der Zelllinien mit Lentiviren, die siRNA spezifisch gegen FoxM1 exprimieren, führte zu einer dramatischen Abnahme von FoxM1. Es konnte eine Reduktion auf 9.23%-47.66% des ursprünglichen Levels von FoxM1 der Kontrollbedingung erreicht werden. Dabei konnte das Proteinlevel von FoxM1 sowohl in allen Medulloblastomzelllinien als auch in der Nicht-Medulloblastomzelllinie HEK293T erfolgreich herunterreguliert werden.

Nachdem FoxM1 erfolgreich in den Zelllinien inhibiert werden konnte, wurde die Zellviabilität mit dem 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT)-Test bestimmt. Eine Reduzierung von FoxM1 Protein in Medulloblastomzelllinien führte zu einer signifikanten Abnahme der Zellviabilität. Es konnte eine Verringerung der Zellviabilität auf bis zu 35 % der Kontrollbedingung, stabil integrierte Kontrollsequenz, erreicht werden (alle $p < 0.05$, Abbildung 3.3B). Der erfolgreiche Knock-down von FoxM1 hatte keinen Einfluss auf die Zellviabilität der HEK293T-Zelllinie (alle $p > 0.05$, Abbildung 3.3B). Ferner wurde per Western Blot das zelluläre Level von Caspase3_{cleaved} überprüft. Eine verstärkte Expression von Caspase3_{cleaved} ist ein Marker für apoptotische Vorgänge und kann somit einerseits die Verringerung der Zellviabilität erklären und andererseits die Beobachtung, dass ein stabiler Knock-down von FoxM1 in Medulloblastomzellen nicht möglich war. Es konnte nach Knock-down von FoxM1 eine Induktion der Expression in Medulloblastomzelllinien, aber nicht in HEK293T Zellen nachgewiesen werden (Abbildung 3.3C). Eine Hochregulation von Caspase3_{cleaved} kann bei Eintreten der *mitotic catastrophe* (Portugal et al., 2010) auftreten. Dies ist bereits bei FoxM1-defizienten Körnerzellvorläuferzellen (Schüller et al., 2007) und bei mit RNAi gegen FoxM1 behandelten Tumoren (Wang et al., 2002) bekannt. Daher wurde im Rahmen dieser Arbeit nach erfolgreichem Knock-down von FoxM1 der Spindelapparat der Medulloblastomzelllinien untersucht.

3.3.2 FoxM1 und klinisch relevante Medikamente

Chemotherapeutika, die derzeit als Standard in der Klinik verwendet werden, sind Vincristin und Cisplatin (Packer et al., 1999; Zeltzer et al., 1999; Xu et al., 2012). Die verwendeten Medulloblastomzelllinien wurden mit diesen beiden Substanzen behandelt und es wurde untersucht, ob ein Zusammenhang zwischen dem Expressionslevel von FoxM1, das durch Transfektion der Zellen mit einem Überexpressionsplasmid manipuliert wurde, und der Reaktion auf die Chemotherapeutika bestand. Es wurde die Zellviabilität mit dem MTT-Assay bestimmt und der Unterschied zwischen Kontrollzelllinien und Zelllinien, bei denen FoxM1 durch ein Plasmid überexprimiert wurde, analysiert.



Die humanen Medulloblastomzelllinien D425med, DAOY, R300 und UW228 wurden mit einem CMV-FoxM1-Plasmid transient transfiziert und das resultierende FoxM1-Proteinlevel in Relation zu Zelllinien, die mit einem Kontrollplasmid transfiziert wurden, per WesternBlot bestimmt. Die Transfektion führte bei D425med-Zellen zu einer gesteigerten Expression von FoxM1 auf das 5.6-fache, bei DAOY zu einem 3.9-fach erhöhtem Level von FoxM1, bei R300 zu einem auf 1.7-fach und bei UW228 zu einem 1.4-fachem FoxM1 Level (3.4A). Dieses veränderte Proteinlevel hatte keinen Einfluss auf die initiale Proliferationsrate der unbehandelten Zelllinien. Die erfolgreich transfizierten Zellen wurden anschließend mit Cisplatin oder Vincristin behandelt. Es wurden Dosis-Wirkungs-Kurven erstellt und die Chemosensitivität der Medulloblastomzelllinien bestätigt Xu et al. (2012). Wenn bei den Medulloblastomzelllinien das Level von FoxM1 durch die Transfektion mit einem Überexpressionsplasmid gesteigert worden war, zeigte sich eine unveränderte Reaktion auf die Chemotherapeutika (3.4B). Die gesteigerte Expression von FoxM1 hatte keinen signifikanten Einfluss auf die Sensitivität der Zelllinien auf die Chemotherapeutika Cisplatin und Vincristin (alle $p > 0.05$).

3.3.3 Auswirkung des Knock-downs von FoxM1 auf die Ausbildung des Spindelapparats

Um eventuelle Artefakte, die bei der Fixierung und Färbung von Zellen auftreten können, zu vermeiden, wurde der Spindelapparat an lebenden Zellen beobachtet. Zu diesem Zweck wurde die Medulloblastomzelllinie DAOY verwendet, da diese bei den Knock-down-Experimenten die größte Reduktion des FoxM1-Proteinlevels aufwies. DAOY-Zellen wurden zuerst mit einem Plasmid transfiziert, das eine fluoreszente Markierung des Spindelapparats ermöglichte. Dieses Plasmid kodiert unter einem CMV-Promotor, der eine starke Expression in allen eukaryotischen Zellen sicherstellt, ein α -Tubulin-GFP (*green fluorescent protein*)-Konstrukt. Die Zellen wurden nach der Transfektion mehrere Male passagiert bevor der Knock-down von FoxM1 durchgeführt wurde. Die transduzierten Zellen wurden auf Glasbodenplatten ausgesät und mit den Lentiviren, die den Knock-down von FoxM1

Abbildung 3.3 (vorhergehende Seite): **Effekte des FoxM1-Knock-downs auf humane Medulloblastomzelllinien.** (A) Humane Medulloblastomzelllinien D425med, DAOY, R300 und UW228 und HEK293T als Kontrollzelllinie wurden mit zwei verschiedenen Knock-down Konstrukten für FoxM1 (shRNA#1 and shRNA#2) transduziert und die resultierenden FoxM1 Proteinlevel relativ zur Kontrolle (Mock Virus) gemessen. Bandenintensitäten wurden auf β -Tubulin normalisiert. Der Verlust von FoxM1 führte in allen behandelten Medulloblastomzelllinien zu einer signifikanten Inhibition der Zellviabilität, eine Reduktion der Zellviabilität bei HEK293T war nicht nachweisbar *, $p < 0.05$; ***, $p < 0.001$; n. s. , $p > 0.05$, (B). Knock-down von FoxM1 induzierte die Proteinexpression von Caspase3_{cleaved} (CASP3_{cl}) in Medulloblastomzelllinien , aber nicht in HEK293T-Zellen (C). β -Aktin wurde als Ladekontrolle verwendet.

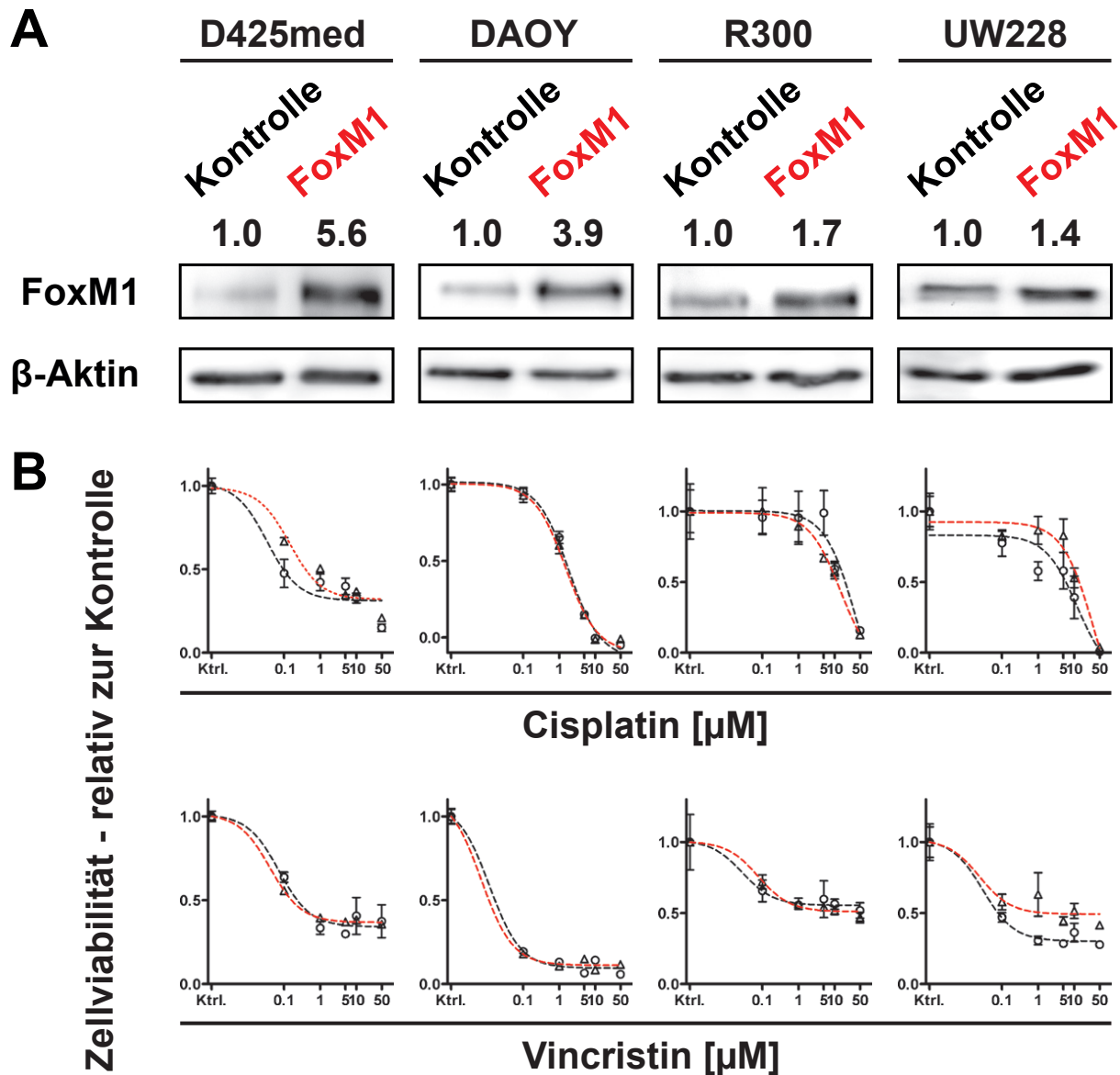


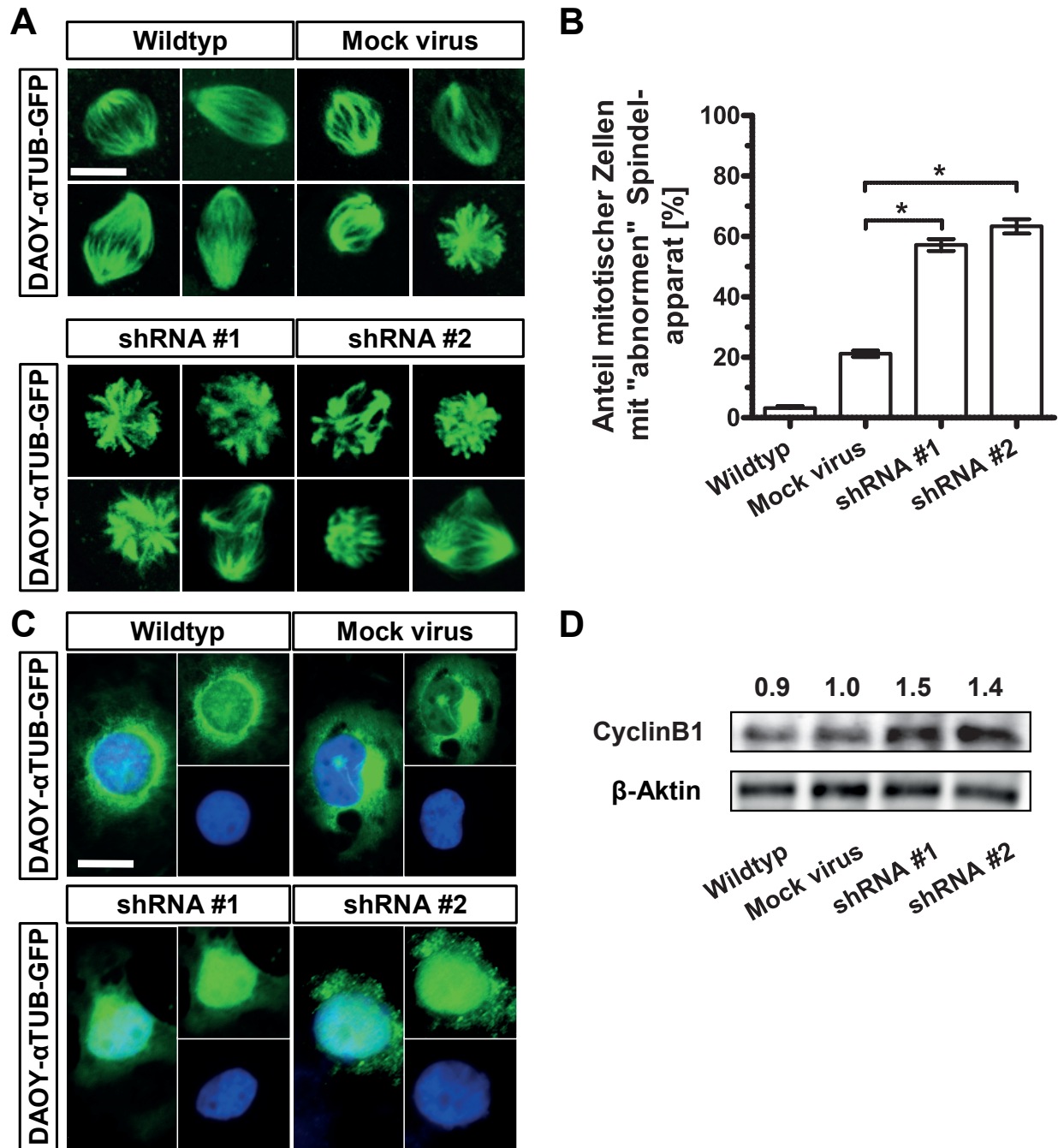
Abbildung 3.4: Überexpression von FoxM1 hatte keinen Einfluss auf die verwendeten Chemotherapeutika. (A) In humanen Medulloblastomzelllinien D425med, DAOY, R300 und UW228 wurde FoxM1 durch Transfektion mit einem Plasmid überexprimiert (FoxM1) und die resultierenden FoxM1-Proteinlevel relativ zur Kontrolle (Kontrolle) gemessen. Bandenintensitäten wurden auf β -Aktin normalisiert. Zahlen zeigen die relativen FoxM1-Proteinlevel an. (B) Überexpression von FoxM1 hatte keinen signifikanten Effekt auf die Inhibierung der Zellviabilität durch die Chemotherapeutika Cisplatin (oben) und Vincristin (unten). schwarz, Kontrolle; rot, FoxM1-Überexpression; alle $p > 0.05$.

bewirkten, infiziert. Die lebenden, unfixierten Zellen wurden 16 h später mit einem konfokalen Laserscanning Mikroskop untersucht (Abbildung 3.5A). Mitotische Zellen, bei denen der Spindelapparat sichtbar war, wurden ausgezählt und der Prozentsatz der Zellen, die einen Spindelapparat mit mehr als zwei Polen („abnormaler“ Spindelapparat) aufwiesen, bestimmt. Nach dem Knock-down von FoxM1 durch zwei verschiedene Konstrukte (shRNA #1 und shRNA #2) hatten signifikant mehr mitotische Zellen einen abnormal ausgebildeten Spindelapparat (57.2% und 63.4%, alle $p < 0.05$) als Wildtypzellen (3.2%) und Zellen, die mit dem Kontrollvirus infiziert wurden (21.2%, Abbildung 3.5B). Desweiteren wurde die subzelluläre Lokalisation und das Gesamtproteinlevel von CyclinB1 untersucht. Translokation von CyclinB1 aus dem Zytoplasma in den Nucleus und ein Anstieg der Gesamtproteinkonzentration deutet auf einen Zellzyklusarrest im Übergang zwischen G₂/M hin (Castedo et al., 2004; Subramaniam et al., 2011), das zusammen mit einer Fehlbildung des Spindelapparats auf das Auftreten der *mitotic catastrophe* hinweist. Knock-down von FoxM1 führte neben der Akkumulation von CyclinB1 im Nucleus (3.5C) zu einer gesteigerten Expression von CyclinB1 (140 % und 150 %) im Vergleich zu den Kontrollen (Wildtyp und Kontrollvirus, 3.5D).

3.3.4 Inhibierung von FoxM1 mit Siomycin A

Radhakrishnan et al. (2006) konnten zeigen, dass FoxM1 durch ein Thiazol, Siomycin A, spezifisch inhibiert werden kann. Aus diesem Grund wurde im nächsten Schritt untersucht, ob die Behandlung der Medulloblastomzelllinien mit Siomycin A einen ähnlichen Effekt hat wie der Knock-down von FoxM1 mit lentiviralen Partikeln. Medulloblastomzelllinien wurden mit steigender Konzentration von Siomycin A behandelt und die Effekte auf das Proteinlevel von FoxM1 und die Zellviabilität bestimmt. Als stark proliferierende, niedrig FoxM1 exprimierende Kontrolle, wurden HEK293T-Zellen verwendet.

Die Behandlung der Medulloblastomzelllinien mit Siomycin A führte zu einer dosisabhängigen Reduktion des FoxM1-Proteinlevels. So bewirkte 10 μ M Siomycin A in den Zelllinien einen Rückgang des endogenen FoxM1-Level auf 54.25 % (Mittelwert, 3.6A) und durch die Behandlung mit 20 μ M Siomycin A sank das mittlere FoxM1-Level auf 42.50 % des FoxM1-Niveaus von DMSO behandelten Zelllinien (Kontrolle). Die Zellviabilität der Medulloblastomzelllinien wurde analog zur Proteinkonzentration durch Siomycin A dosisabhängig inhibiert (3.6B). Die Abnahme der Zellviabilität war nur in Medulloblastomzelllinien zu beobachten, nicht in HEK293T-Zellen. Diese Zelllinie, die eine niedrige endogene FoxM1-Expression zeigte, konnte durch die Gabe von Siomycin A in ihrem Wachstum nicht inhibiert werden, obwohl das FoxM1-Level erfolgreich herunterreguliert werden konnte. Hohe Konzentrationen von Siomycin A resultierten bei dem MTT-Test bei behandelten Medulloblastomzelllinien in einer optischen Dichte (OD), die unterhalb der Start-OD lag ($OD < 0$) und zeigten somit einen Rückgang der Zellzahl an. Nachfolgend wurde per Western Blot das Expressionsniveau des Apoptosemarkers Caspase3_{cleaved} bestimmt. Behandlung der Medulloblastomzelllinien mit Siomycin A führte zu einer Induktion der Expression von Caspase3_{cleaved}. Dieser Effekt war in HEK293T-Zellen nicht zu beobachten (3.6C).

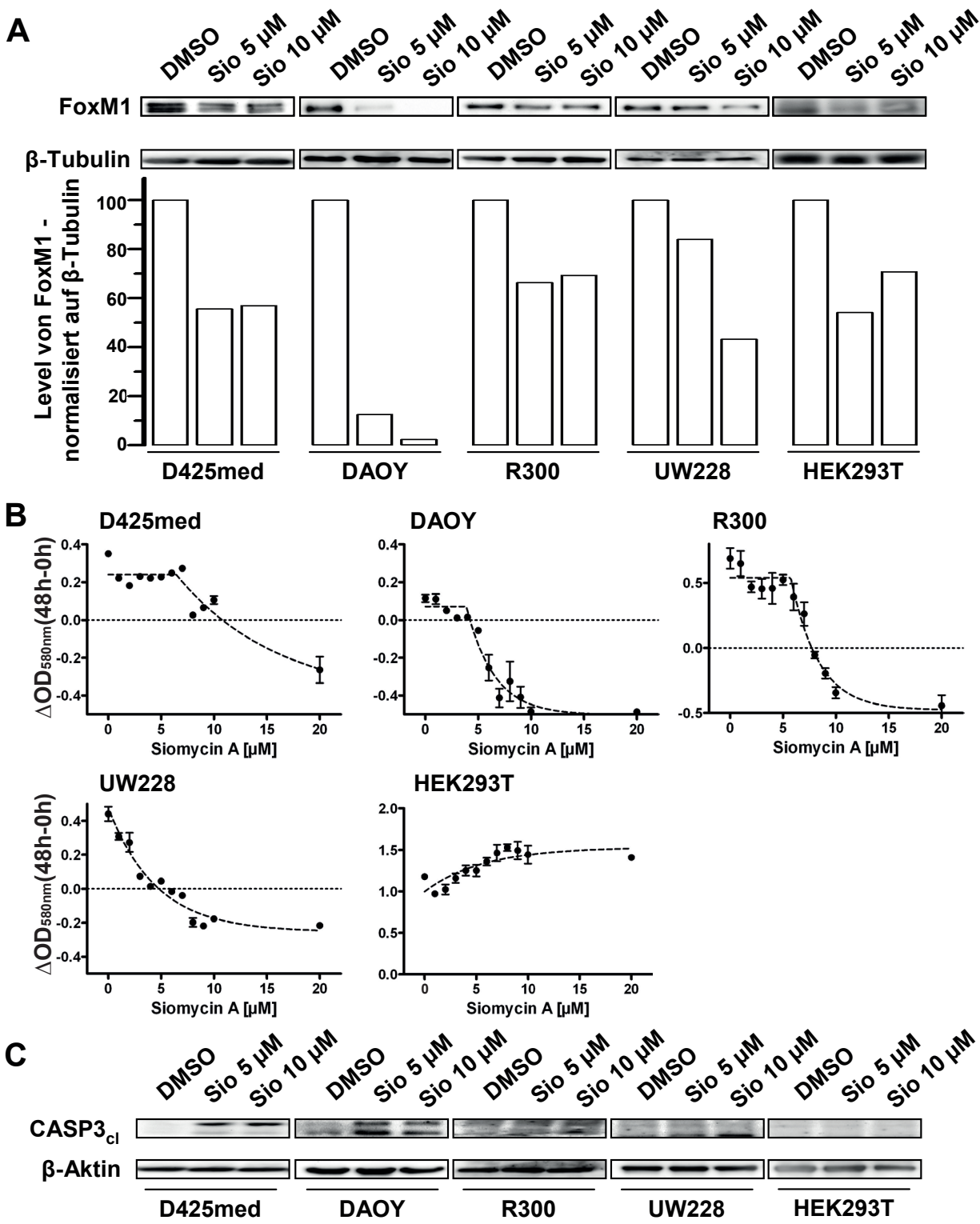


3.3.5 Siomycin A bewirkt eine Fehlbildung des Spindelapparats

Analog zu den Ergebnissen aus den Knock-down-Experimenten wurden Medulloblastomzellen untersucht um den Effekt von Siomycin A auf die Ausbildung des Spindelapparats zu untersuchen. Hierfür wurden wie in Kapitel 3.3.3 DAOY-Zellen mit α -Tubulin-GFP transfiziert und auf Glasbodenplatten ausgesät. Die Zellen wurden nach mehreren Passagen (mindestens fünf) mit Siomycin A behandelt und 16 h im Brutschrank inkubiert. Dann wurde der Spindelapparat mitotischer Zellen mit einem konfokalen Laserscanning-Mikroskop visualisiert und die Ergebnisse quantifiziert.

Zugaben von Siomycin A in das Medium der Medulloblastomzellen führte zu einer signifikanten Steigerung von fehlgebildeten („abnormaler“ Spindelapparat) Spindelapparaten (32.6 %) gegenüber DMSO behandelten Kontrollzellen (3.4 %, $p < 0.05$, Abbildung 3.7A, B). Die Behandlung der Zellen mit DMSO hatte keinen signifikanten Effekt auf die Ausbildung von normalen diplolaren Spindelapparaten in Bezug zu unbehandelten Zellen (3.4 % vs. 3.2 %, $p > 0.05$). Herunterregulation von FoxM1 mit 5 μ M Siomycin A hatte den selben Einfluss auf die subzelluläre Lokalisation von CyclinB1 wie der Knock-down mit lentiviralen Partikeln. Auch hier führte die 16-stündige Behandlung mit 5 μ M Siomycin A zu einer Translokation von CyclinB1 (grün) vom Zytoplasma der Zelle in den Nucleus (blau) von DAOY Medulloblastomzellen (Abbildung 3.7C). Ebenso konnte gezeigt werden, dass nach der Behandlung von Medulloblastomzellen mit 5 μ M Siomycin A eine um den Faktor 2.4 verstärkte Expression von CyclinB1 in Gesamtzelllysaten nachweisbar war (Abbildung 3.7D). Die Ergebnisse aus den Knock-down-Experimenten konnten durch die Behandlung der Zelllinien mit dem spezifischen FoxM1-Inhibitor Siomycin A bestätigt werden. FoxM1 ist *in vitro* wichtig für die Proliferation der Medulloblastomzellen und in den nächsten Experimenten wurde die Funktion von FoxM1 *in vivo* untersucht.

Abbildung 3.5 (vorhergehende Seite): **Auswirkung des Knock-downs von FoxM1 auf die Ausbildung des Spindelapparats.** Die Medulloblastomzelllinie DAOY wurde stabil mit einem α -Tubulin-GFP (α -TUB-GFP) Konstrukt transfiziert und auf Glasbodenplatten (MatTek Corp., Ashland, MA, USA) ausgesät. Die Morphologie des Spindelapparats wurde mit einem konfokalen Laserscanning-Mikroskop (Zeiss, Oberkochen) in Wildtypzellen, mit Kontrollvirus (Mock Virus) und FoxM1-Knock-down-Virus (shRNA #1 und shRNA #2) infizierten DAOY-Zellen visualisiert, Maßstab=10 μ m (**A**). (**B**) Quantifizierung der Daten aus (**A**) ergaben einen signifikant höheren Anteil von mitotischen Zellen mit einem abnormen Spindelapparat wenn FoxM1 herunterreguliert war (*, $p < 0.05$). (**C**) Doppelimmunfluoreszenzfärbung von DAOY-Zellen auf CyclinB1 (grün) und DAPI (blau). Nach dem Knock-down von FoxM1 zeigten die Zellen eine Translokation von CyclinB1 vom Zytoplasma in den Nucleus. Maßstab=20 μ m. (**D**) Herunterregulation von FoxM1 führte zu einer gesteigerten Expression von CyclinB1 Protein. Die Zahlen zeigen das Level von CyclinB1 relativ zur Kontrolle (Mock Virus). β -Aktin wurde als Ladekontrolle verwendet.



3.3.6 FoxM1 als mögliches Bindeglied zwischen Shh- und Wnt-Signalweg

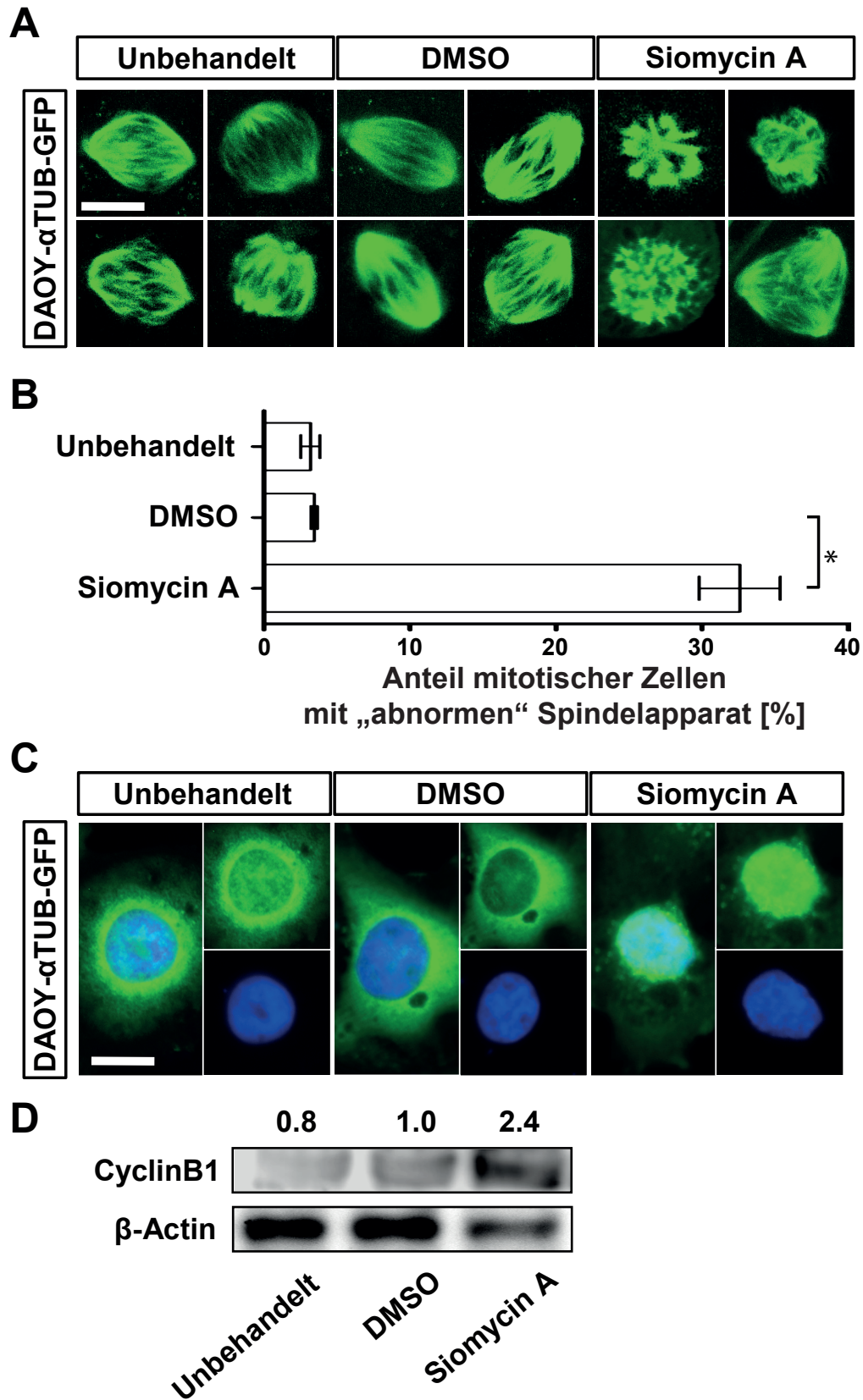
Verschiedene Arbeitsgruppen untersuchen mögliche Verbindungen zwischen den hoch konservierten Signalwegen *sonic hedgehog* und Wnt bei verschiedenen Tumoren und in der Entwicklungsbiologie Jenkins (2009); Kim et al. (2010); Ulloa et al. (2007); Alvarez-Medina et al. (2009). Im Rahmen dieser Arbeit wurde untersucht, ob auch FoxM1 bei dieser Fragestellung eine Rolle spielt.

Als Modelllinie wurde DAOY verwendet, da bei dieser Zelllinie sowohl der Knock-down mittels Lentiviren als auch die Behandlung mit Siomycin A den stärksten Effekt auf das Proteinlevel von FoxM1 hatte (siehe Kapitel 3.3.1 und Kapitel 3.3.4).

In der humanen Medulloblastomzelllinie DAOY wurde FoxM1 durch lentiviral vermittelten Knock-down oder durch die Behandlung mit Siomycin A herunterreguliert und immunohistochemisch die subzelluläre Verteilung von β -Catenin untersucht. β -Catenin ist ein membranständiges Protein, das bei der Aktivierung des Wnt-Signalwegs in den Nucleus transloziert und dort als Transkriptionsfaktor die Aktivierung von Wnt-spezifischen Genen induziert. Abbildung 3.8A zeigt die Ergebnisse der Experimente. Wurde das Proteinlevel von FoxM1 bei der Medulloblastomzelllinie DAOY durch lentiviralen Knock-down oder durch Siomycin A stark erniedrigt, erfolgte die Translokation von β -Catenin von der Zellmembran in den Nucleus der Zelle. Die Quantifizierung der Daten ergab, dass die Behandlung der Zelllinie mit Siomycin A zu einem Anteil von 21.42 % Zellen mit nukleären β -Catenin führt, wobei in der Kontrollbehandlung mit DMSO bei 0.93 % der Zellen β -Catenin im Zellkern zu finden war ($p < 0.001$). Die Behandlung der DAOY-Zellen mit dem unspezifischen Kontrollvirus (Mock Virus) hatte einen Anteil von 3.86 % der Zellen zur Folge, bei denen nukleäres β -Catenin nachweisbar war. Eine Infektion der Zellen mit einem spezifischen Knock-down-Konstrukt gegen FoxM1 ergab einen Anteil von 21.57 % Zellen mit nukleären β -Catenin ($p < 0.001$, Abbildung 3.8B).

Als nächstes wurde die Frage untersucht, ob die Aktivierung des Wnt-Signalwegs bei humanen Medulloblastomzelllinien eine Auswirkung auf die Proliferation hat. Hierfür wurde der Wnt-Signalweg bei den vier verwendeten Medulloblastomzelllinien durch die Trans-

Abbildung 3.6 (vorhergehende Seite): **Behandlung von humanen Medulloblastomzelllinien mit Siomycin A.** (A) Humane Medulloblastomzelllinien D425med, DAOY, R300 und UW228 wurden mit zwei verschiedenen Konzentrationen von Siomycin A (Sio 5 μ M und Sio 10 μ M) behandelt und das resultierende FoxM1 Proteinlevel bestimmt. Die Proteinlevel wurden auf DMSO-behandelte Kontrollzellen (Kontrolle) normiert. β -Tubulin wurde als Ladekontrolle verwendet. HEK293T-Zellen wurden als Nicht-Medulloblastomzellen verwendet. (B) Die Zellviabilität ging dosisabhängig mit steigender Siomycin A-Konzentration in den Medulloblastomzelllinien zurück, aber nicht in den HEK293T-Zellen. Alle Medulloblastomzelllinien zeigten eine Expression von Caspase3_{cleaved} (CASP3_{cl}) nach Behandlung mit Siomycin A. In HEK293T war keine Induktion zu beobachten (C). β -Aktin wurde als Ladekontrolle verwendet.



fektion mit einem Plasmid aktiviert (Abbildung 3.8C). Dieses Plasmid kodiert für eine mutierte Form des β -Catenins, das in den Nucleus der Zelle translokiert und somit einen aktivierten Wnt-Signalweg hervorruft. Als Kontrollzelllinie wurde die humane Magenkarzinomzelllinie AZ521 verwendet, die einen endogen aktivierten Wnt-Signalweg aufweist (Tanaka et al., 2011). Die Transfektion der Zelllinie AZ521 mit dem Wnt-Plasmid hatte zu keinem Zeitpunkt (24 h, 48 h, 72 h) einen Einfluss auf die Zellproliferation. 24 h nach der Transfektion mit dem Wnt-Plasmid wurde bei allen vier verwendeten Medulloblastomzelllinien (D425med, DAOY, R300, UW228) im Vergleich zu einem Kontrollplasmid eine signifikant verringerte Proliferationsrate mit dem MTT-Test gemessen (mittlere Zellviabilität=0.695, $p<0.05$). Die mittlere Proliferationsrate betrug 48 h nach der Transfektion 0.487 ($p<0.001$) und nach 72 h 0.431 ($p<0.001$).

Die Verwendung eines Agonisten des Wnt-Signalwegs ist eine weitere Möglichkeit, eine Aktivierung des Signalwegs zu erreichen. Der Versuch wurde mit der Chemikalie 6BioX wiederholt, von der bekannt ist, dass die Behandlung zu einer Aktivierung des Wnt-Signalwegs führt (Tseng et al., 2006). Als Kontrolle wurde wieder die humane Magenkarzinomzelllinie AZ521 verwendet. Steigende Konzentrationen von 6BioX hatten keinen Einfluss auf die Proliferationsrate dieser Zelllinie, bei der endogen der Wnt-Signalweg aktiviert ist. Eine Aktivierung des Wnt-Signalwegs durch steigende Konzentrationen von 6BioX hatte bei allen vier untersuchten Medulloblastomzelllinien eine dosis-abhängige Inhibierungen der Zellproliferation zur Folge (alle $p<0.05$).

Abbildung 3.7 (vorhergehende Seite): **Siomycin A bewirkt eine Fehlbildung des Spindelapparats.** Die Medulloblastomzelllinie DAOY wurde stabil mit einem α -Tubulin-GFP (α -TUB-GFP)- Konstrukt transfiziert und auf Glasbodenplatten (MatTek Corp., Ashland, MA, USA) ausgesät. Der Spindelapparat mitotischer Zellen wurde mit einem konfokalen Laserscanning-Mikroskop (Zeiss, Oberkochen) erfasst. Bilder wurden von Wildtypzellen (Unbehandelt), DMSO-behandelten Kontrollzellen (DMSO) und von mit 5 μ M Siomycin A behandelten Medulloblastomzellen aufgenommen ((**A**), Maßstab=10 μ m). Nach der Herunterregulation von FoxM1 durch 5 μ M Siomycin A zeigten signifikant mehr mitotische Zellen eine Fehlbildung des Spindelapparats als Kontrollzellen (*, $p<0.05$, (**B**). (**C**) Doppelimmunfluoreszenzfärbung von DAOY-Zellen auf CyclinB1 (grün) und DAPI (blau). Behandlung der Zellen mit Siomycin A führte zu einer Translokation von CyclinB1 vom Zytoplasma in den Nucleus. Maßstab=20 μ m. (**D**) Nach Zugabe von Siomycin A exprimierten die Zellen vermehrt CyclinB1. Die Zahlen zeigen das Level von CyclinB1 relativ zur Kontrolle (DMSO). β -Aktin wurde als Ladekontrolle verwendet.

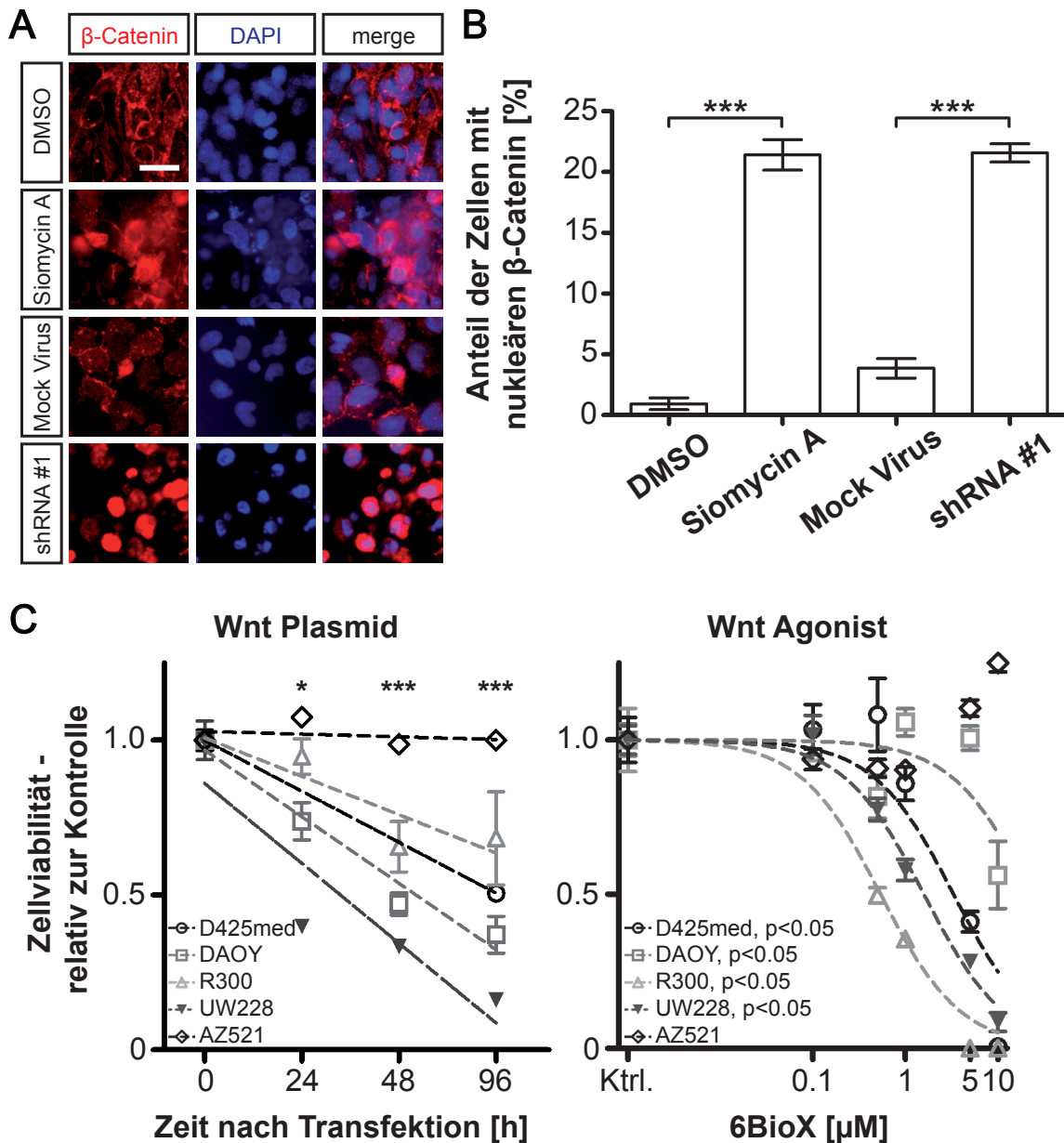


Abbildung 3.8: Die Inhibierung von FoxM1 in Medulloblastommodellen aktiviert den Wnt-Signalweg. FoxM1 wurde in der Medulloblastomzelllinie DAOY mit lentiviralen Partikeln (siFox) oder mit 5 μ M Siomycin A (Sio) inhibiert und die Zellen nach der Behandlung auf β -Catenin gefärbt. Inhibierung von FoxM1 führte zur Translokation von β -Catenin in den Nucleus (A). (B) Die Quantifizierung der Daten aus (A) zeigt einen signifikant höheren Anteil von Medulloblastomzellen, die β -Catenin im Nucleus aufwiesen. Sowohl eine Aktivierung des Wnt-Signalwegs durch transiente Transfektion mit einem BCat-Plasmid (C), als auch eine Behandlung der Medulloblastomzellen D425med, DAOY, R300 und UW228 mit dem Wnt Agonisten 6BioX führte zu einer Verringerung der Zellviabilität. Als Wnt-insensitive Kontrollzelllinie wurde die Kolon Zelllinie AZ521 verwendet. (*, $p < 0.05$; ***, $p < 0.001$)

3.4 *In vivo*-Experimente zur Funktion von FoxM1 in murinen Medulloblastomen

Die erzielten *in vitro* Ergebnisse deuteten darauf hin, dass FoxM1 eine wichtige Rolle im Wachstum und in der Progression von Medulloblastomen spielt. Die Ergebnisse sollten nun *in vivo* bestätigt werden. Dazu wurde ein etabliertes Mausmodell des Shh-abhängigen Medulloblastoms verwendet. Diese transgene Maus trägt an Position 535 eine Punktmutation im *Smo*-Gen, was zu einer konstitutiven Aktivierung des Shh-Signalwegs führt. Wenn diese Aktivierung in hGFAP- oder Math1-gefatemappten Zellen stattfindet, entwickelt die Maus ein Medulloblastom, an dem sie dann letztendlich verstirbt (Schüller et al., 2008).

3.4.1 Einfluss von FoxM1 auf das Überleben von hGFAP-cre::*SmoM2^{fl/+}*-Mäusen

Zur Untersuchung des Einflusses von FoxM1 wurden dreifach transgene Mäuse generiert, die zusätzlich zu der konstitutiven Aktivierung des Shh-Signalwegs einen Cre-vermittelten Knock-out von FoxM1 ermöglichten. Der Gesundheitszustand dieser Mäuse wurde täglich kontrolliert und nach dem Versterben der Mäuse wurde das Cerebellum bzw. das Medulloblastom präpariert.

Abbildung 3.9A zeigt die Überlebenskurven, die mit der Methode nach Kaplan und Meier (Kaplan and Meier, 1958) generiert wurde. Die mittlere Überlebensdauer der beiden Gruppen (*Foxm1^{fl/+}*, n=16) und (*Foxm1^{fl/fl}*, n=15) lag bei beiden Kohorten bei 13.0 Tagen, wobei zwischen beiden Gruppen kein signifikanter Unterschied bestand ($p=0.5569$). 100 % der transgenen Mäuse entwickelten hierbei ein Medulloblastom, an dem auch alle Mäuse verstarben.

Zur Kontrolle des Knock-outs von FoxM1 wurde die Rekombination des *Foxm1* Allels innerhalb der Tumoren kontrolliert. Hierfür wurde gDNA aus den Medulloblastomen isoliert und per PCR der Genotyp bestimmt. Die erwarteten Größen der amplifizierten Produkte waren 284 bp (Wildtyp), 318 bp (gefloxtes Allel) sowie 400 bp (Nullallel). Die gebildeten Tumoren wiesen nur eine unvollständige Rekombination von *Foxm1* auf (Abbildung 3.9B, was durch die verbliebene Bande bei 318 bp im homozygoten Knock-out verdeutlicht wurde. Ferner wurde das Expressionslevel von FoxM1-Protein der Tumoren im Western Blot bestimmt. Bei vollständigem Knock-out des Gens sollte auf dem zugehörigen Western Blot kein Protein mehr zu finden sein. In allen untersuchten Tumoren war jedoch noch FoxM1 nachweisbar (47.8 % und 63.9 % in Bezug zu Kontrolltumoren, Abbildung 3.9C).

In allen untersuchten Tumoren war aufgrund der unvollständigen Rekombination bei der *Foxm1* Allele noch FoxM1 vorhanden und es konnte keine Wachstumsinhibierung festgestellt werden. Ein Rückschluss auf die Bedeutung von FoxM1 für das Wachstum des murinen Medulloblastoms konnte deshalb nicht gezogen werden.

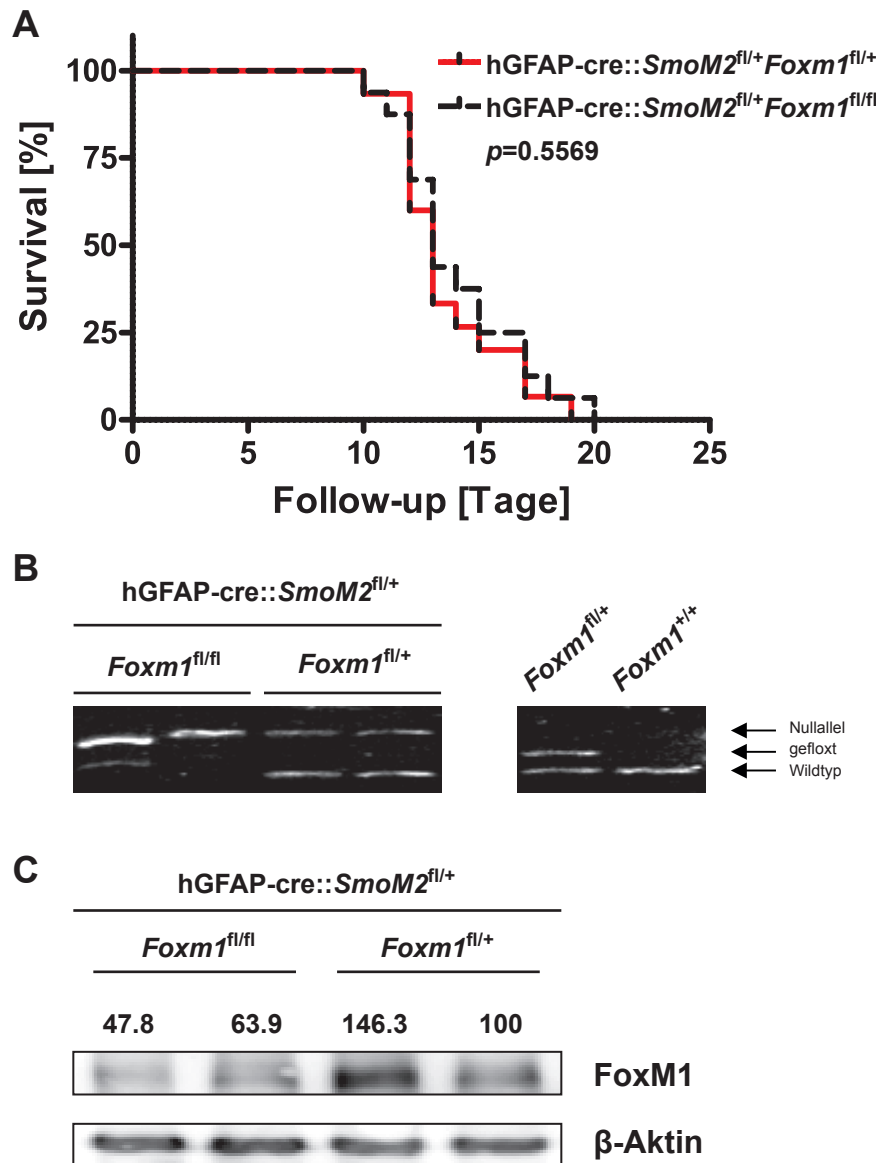


Abbildung 3.9: Einfluss von FoxM1 auf das Überleben von hGFAP-cre::SmoM2^{fl/+}-Mäusen. (A) Das Überleben von hGFAP-cre::SmoM2^{fl/+}-Mäusen (n=16) wurde durch Kaplan-Meier-Analysen untersucht. Der homozygote Knock-out von FoxM1 (Foxm1^{fl/fl}, n=15) hatte keinen signifikanten Effekt auf das Überleben ($p=0.5569$). (B) Entstandene murine Medulloblastome wurden mittels PCR auf erfolgte Rekombination untersucht. Die amplifizierten Produkte zeigten, dass Foxm1 in den Tumoren nur unvollständig rekombiniert wurde. Expression von FoxM1-Protein in den transgenen Tumoren wurde durch Western Blot analysiert. Foxm1^{fl/fl}-Tumoren exprimierten weiterhin FoxM1-Protein (47.8 % und 63.9 % der Kontrolltumoren, (C)).

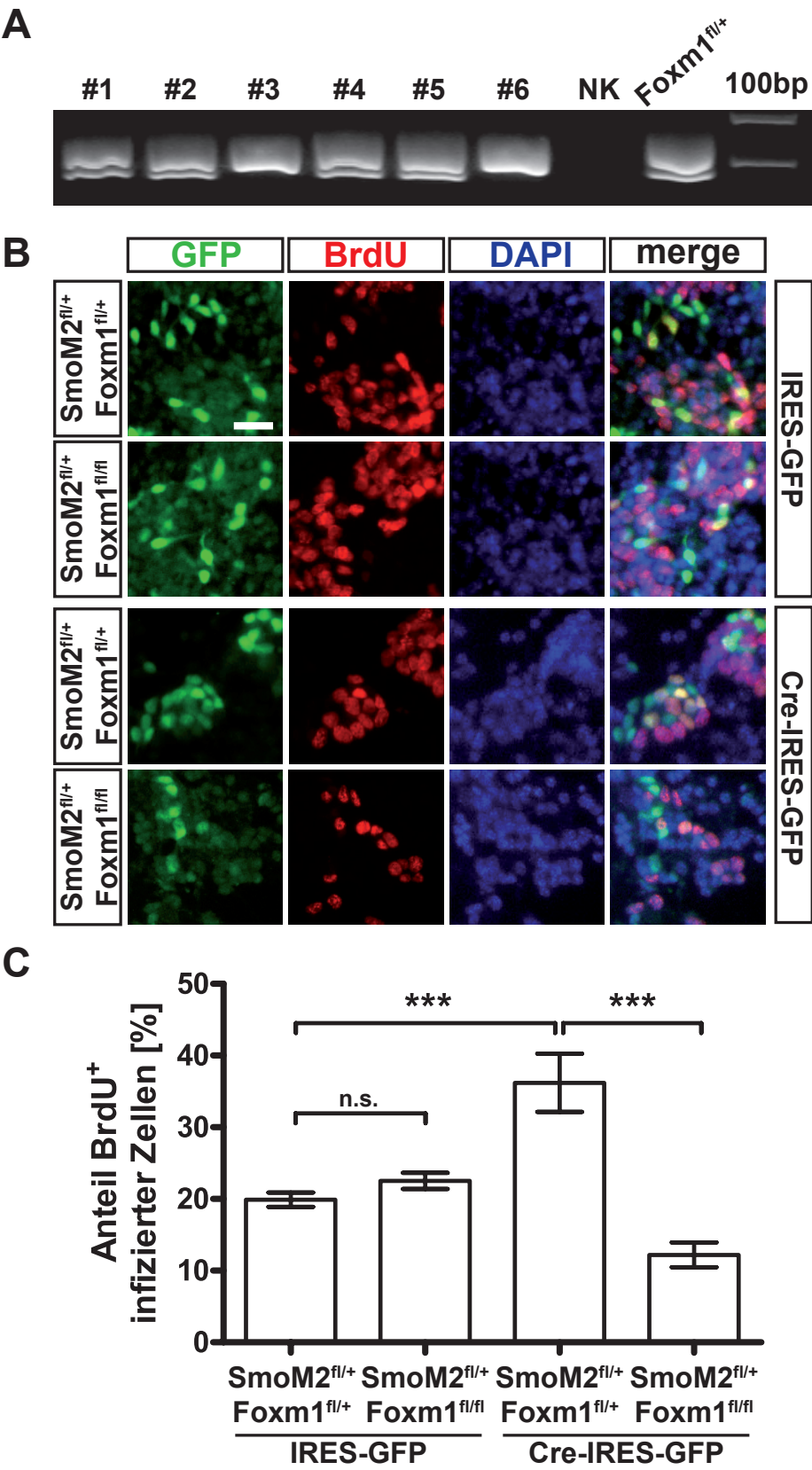
3.4.2 Akuter Knock-out von FoxM1 in primären Medulloblastomkulturen

Da FoxM1 nicht langfristig aus den Tumoren entfernt werden konnte, wurde der direkte Effekt des Verlustes von FoxM1 in Medulloblastomen untersucht. Hierfür wurden Primärkulturen von P5-Mäusen gemäß Kapitel 2.6.2 angelegt. Medulloblastomzellen von *SmoM2^{fl/+}Foxm1^{fl/+}*- bzw. *SmoM2^{fl/+}Foxm1^{fl/fl}*-Mäusen wurden kultiviert und mit lentiviralen Partikeln, die eine Expressionssequenz für eine Cre-Rekombinase tragen, infiziert. Die Proliferationsrate der Tumorzellen konnte nach einer Doppelimmunfluoreszenzfärbung gegen GFP, das alle erfolgreich infizierten Zellen anzeigt, und BrdU ausgezählt werden.

Für die Bestimmung der Proliferationsrate der Tumorzellen wurden diese in 24well-Platten ausgesät und mit Lentivirus infiziert. Diese Lentiviren kodieren für eine GFP-Sequenz, weswegen die virusinfizierten Zellen direkt unter dem Immunfluoreszenzmikroskop sichtbar gemacht werden konnten. Die Proliferationsrate konnte durch ein Labelling mit BrdU ermittelt werden. Hierfür wurde dem Medium eine definierte Menge BrdU zugesetzt, das die Zellen aufnahmen. BrdU ist ein Basenanalogon von Thymidin und wurde anstelle dieses Nukleosids bei der Neusynthese der DNA verwendet. Da die Neusynthese von DNA nur während der S-Phase des Zellzyklus stattfindet, konnte nach immunhistochemischem Nachweis direkt auf die Proliferationsrate der Zellen geschlossen werden.

Abbildung 3.10A zeigt das typische Ergebnis der Genotypisierung von *SmoM2^{fl/+}Foxm1^{fl/+}*- bzw. *SmoM2^{fl/+}Foxm1^{fl/fl}*-Mäusen, die für die Experimente verwendet wurden. Mäuse wurden an P5 präpariert und es wurden adherente Tumorzellkulturen angelegt. Nachdem die Zellen mit Cre-exprimierenden Lentiviren infiziert worden waren, konnten diese BrdU-gepulst werden, um den akuten Effekt des vollständigen Knock-outs von FoxM1 auf die Proliferationsrate bestimmen zu können. Abbildung 3.10B zeigt die charakteristischen Ergebnisse der Immunfluoreszenzfärbungen. Alle GFP⁺-Zellen wurden erfolgreich mit Virus infiziert und alle BrdU⁺-Zellen befanden sich in der S-Phase des Zellzyklus, als die Kultur fixiert wurde. Die fluoreszierenden Zellen wurden ausgezählt und der Quotient $\frac{\text{BrdU}^+ \text{GFP}^+ \text{Tumorzellen}}{\text{GFP}^+ \text{Tumorzellen}} [\%]$ berechnet.

In der Kontrollbedingung mit einem Lentivirus, der nur GFP, aber kein Cre exprimiert und somit keine Rekombination von FoxM1 ermöglichte, befanden sich 19.9 % (*SmoM2^{fl/+}Foxm1^{fl/+}*) oder 22.5 % (*SmoM2^{fl/+}Foxm1^{fl/fl}*, $p > 0.05$) der infizierten Zelle in der S-Phase des Zellzyklus. Wurde durch eine Rekombination des mutierten SmoM2-Allels zusätzlich der endogene Shh-Signalweg konstitutiv aktiviert ohne dass FoxM1 vollständig verloren ging (*SmoM2^{fl/+}Foxm1^{fl/+}*), stieg der Anteil der proliferierenden Zellen auf 36.2 % signifikant an ($p < 0.001$). Wenn zusätzlich FoxM1 komplett aus den Zellen deletiert wurde (*SmoM2^{fl/+}Foxm1^{fl/fl}*), deren endogener Shh-Signalweg aktiviert wurde war, sank der Anteil der BrdU⁺-infizierten Tumorzellen signifikant auf 12.2 % ab ($p < 0.001$). Es konnte ein akuter Effekt des Verlustes von FoxM1 auf Shh-abhängige Medulloblastome gezeigt werden. Eine weitere Technik, um einen Knock-out eines gefloxtes Genes zu erzielen, ist die Injizierung von Lentiviren, die zu der Expression von Cre-Rekombinase führen.



3.4.3 Injektion lentiviraler Partikel

Als Medulloblastommodell diente die Linie Math1-cre::*SmoM2^{fl/+}*. Tiere dieser Linie haben eine mittlere Überlebenszeit von 28 Tagen und versterben an einem Medulloblastom. Zum Knock-out von FoxM1 wurden den Mäusen an P14 intrakraniell lentivirale Partikel, die shRNA-Sequenzen für FoxM1 kodieren, injiziert und es wurde die anschließende Überlebenszeit beobachtet.

Die Effektivität der lentiviralen Partikel wurde an murinen SJMM4-Zellen *in vitro* bestimmt. Diese Zelllinie wurde 2003 aus einem murinen Medulloblastom etabliert (Li et al., 2003). Die Zellen wurden mit Lentiviren infiziert und die Proliferation mittels MTT-Test gemessen.

Die Wirksamkeit des Knock-outs von FoxM1 bei der murinen Medulloblastomzelllinie SJMM4 zeigt Abbildung 3.11A. Der Knock-out von FoxM1 wurde mit zwei verschiedenen RNAi-Sequenzen durchgeführt (mshRNA #1 und mshRNA #2) und der Effekt relativ zur unspezifischen RNAi-Sequenz berechnet. Nur die Transduktion der Zellen mit einer Sequenz, mshRNA #1, hatte eine signifikante Reduktion der Proliferation um 25 % zur Folge ($p=0.038$). Der Knock-down von FoxM1 im murinen System mit der anderen Sequenz, mshRNA #2, hatte keinen signifikanten Einfluss auf die Zellproliferation der Zelllinie ($p=0.20$).

Im nächsten Schritt wurden die lentiviralen Partikel *in vivo* angewendet. Hierfür wurden die Mäuse des Genotyps Math1-cre::*SmoM2^{fl/+}* an Postnataltag 14 mit den beiden lentiviralen Knock-out-Konstrukten behandelt und es wurde das Überleben der Mäuse beobachtet. Als Kontrolle wurden diese Mäuse, bei denen 100 % ein Medulloblastom entwickeln und daran versterben, ein Lentivirus injiziert, das für eine unspezifische Sequenz kodiert (mittleres Überleben 31.5 Tage). Die Effekte der lentiviralen Partikel *in vivo* zeigt Abbildung 3.11B. Das Überleben von Math1-cre::*SmoM2^{fl/+}*-Mäusen, die mit dem Knock-out-Konstrukt mshRNA #2, das auch *in vitro* keine signifikante Reduktion der SJMM4-Zelllinie erzielen konnte, behandelt wurden, unterschied sich nicht signifikant von dem der Kontrollmäuse (mittleres Überleben 33.0 Tage, $p>0.05$). Diejenigen Mäuse, denen das Konstrukt mshRNA #1 an P14 injiziert wurde, überlebten signifikant länger als die kon-

Abbildung 3.10 (vorhergehende Seite): **Akuter Verlust von FoxM1 vermindert die Proliferationsrate von Medulloblastomtumorzellen.** (A) Mäuse wurden für *Foxm1* genotypisiert und dichotomisiert in *SmoM2^{fl/+}Foxm1^{fl/+}* (#1, #2, #4, #5) und *SmoM2^{fl/+}Foxm1^{fl/fl}* (#3, #6), NK=Negativkontrolle, 100bp=Größenmarker. (B) Murine Tumorzellen wurden mit Lentiviren, die nur GFP exprimieren (Kontrollvirus, IRES-GFP) oder mit Cre-Rekombinase und GFP-exprimierenden Lentiviren (Cre-IRES-GFP) infiziert und anschließend mit BrdU gepulst. Nach der Fixierung der Zellen wurden diese immunfluoreszent gefärbt, Maßstab=50 µm. (C) Die Quantifizierung der Daten aus (B) ergab signifikant mehr proliferierende Tumorzellen, wenn konstitutiv der Shh-Signalweg aktiviert wurde (***, $p<0.001$). Wenn zusätzlich *Foxm1* aus dem System entfernt wurde, sank die Proliferationsrate signifikant ab (***, $p<0.001$).

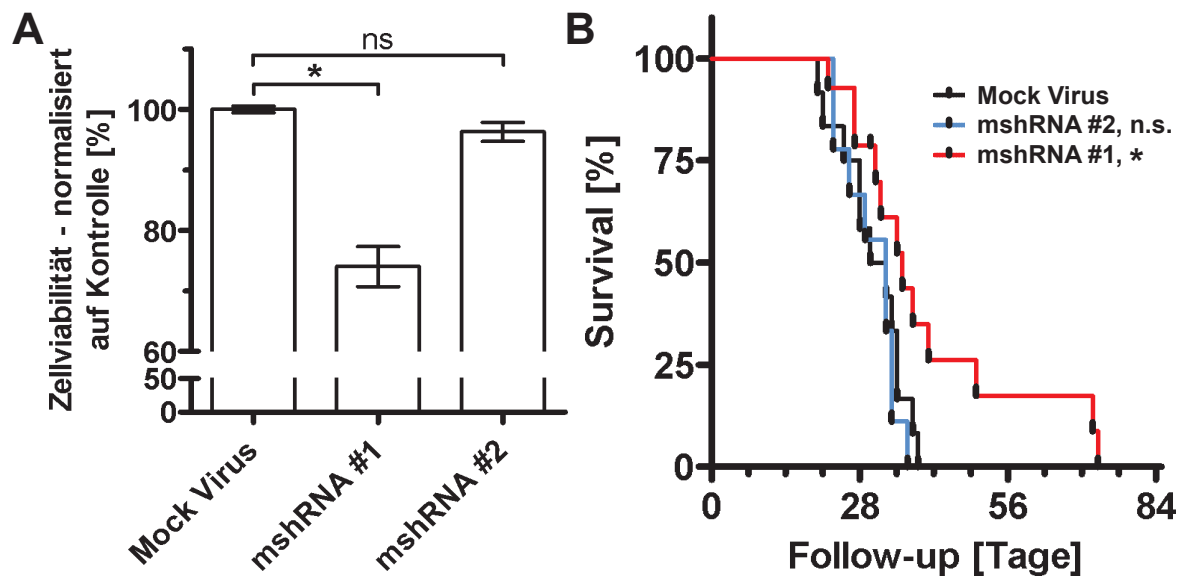


Abbildung 3.11: **Effekt von lentiviral vermitteltem Knock-down von FoxM1 im murinen Medulloblastom.** (A) Der Knock-down von FoxM1 (mshRNA #1 und mshRNA #2) in murinen SJMM4-Medulloblastomzellen führt zur Abnahme der Zellviabilität bei Konstrukt mshRNA #1, nicht aber bei Konstrukt mshRNA #2 (*, $p < 0.05$, n.s., $p > 0.05$). Die Injektion der Lentiviren in den IV. Ventrikel von P14 Math1-cre::*SmoM2^{fl/+}* Mäusen führt zur Verlängerung der mittleren Überlebenszeit bei Verwendung von Konstrukt mshRNA #1. Die Injektion von Konstrukt mshRNA #2 hatte keinen Einfluß auf die Überlebenszeit der transgenen Mäuse (*, $p < 0.05$, n.s., $p > 0.05$).

trollbehandelten Mäuse (mittleres Überleben 36.0 Tage, $p < 0.05$). Dieses Konstrukt war auch *in vitro* bei SJMM4 Zellen wirksam.

3.4.4 Effekt von Siomycin A bei Xenograftmodellen

Eine weitere Möglichkeit um das Tumorwachstum *in vivo* zu untersuchen, ist die Verwendung von Xenograftmodellen an NMRI-nu/nu-Mäusen. Die Inokulation der *in vitro* angezüchteten Tumorzellen erfolgte dabei subkutan beidseitig in die Flanke der Mäuse. Nach erfolgreichem Anwachsen der bilateral eingebrachten Tumoren wurde mit der Therapie begonnen. Die Mäuse wurden zufällig in zwei Gruppen eingeteilt. Eine Gruppe (Siomycin A) wurde alle zwei Tage mit einer Dosis von 50 mg/kg Siomycin A behandelt, der anderen Gruppe (Vehikel) wurde ein entsprechendes Volumen Kontrollsubstanz injiziert. Das Volumen der Tumoren wurde regelmäßig erfasst und bei Erreichen einer Größe von 1500 mm³ wurde die Maus aus dem Versuch entnommen.

Abbildung 3.12A zeigt die gemessenen Tumorgößen. In der Kontrollgruppe (n=8) wurde bei einer mittleren Tumorgöße von 245.0 mm³ mit der Behandlung begonnen. Die Tumoren, die mit Siomycin A behandelt wurden (n=8), wiesen eine mittlere Größe von 207.6 mm³ bei Beginn der Behandlung auf. Insgesamt wurde über einen Zeitraum von 18 Tagen behandelt und die Tumorgöße erfasst. An Tag 10 nach Beginn der Behandlung wurde eine Maus aus der Kontrollgruppe entnommen, da der Tumor eine Größe von 1521 mm³ erreicht hatte und somit das Abbruchkriterium erreicht hatte. Abbildung 3.12B zeigt die mittleren Tumorgößen an den Messtagen. Es wurden lineare Regressionsgeraden für die zwei Gruppen erstellt und mittels F-Test der Unterschied der Steigungen der Geraden berechnet. Beide Steigungen unterschieden sich nicht signifikant voneinander ($p > 0.05$). Da an Tag 10 eine Maus aus der Kontrollgruppe entnommen werden musste, wurden für eine neue Berechnung der Regressionsgeraden nur die Messwerte bis einschließlich Tag 10 verwendet (Abbildung 3.12C). Wurden nur die ersten vier Messwerte verwendet, unterschieden sich die beiden Regressionsgeraden signifikant voneinander ($p < 0.05$).

3.4.5 Interaktion von FoxM1 und Wnt

Seit kurzem ist bekannt, dass FoxM1 ein möglicher Interaktionspartner des Wnt-Signalwegs *in vivo* darstellt (Zhang et al., 2011; Balli et al., 2011). Ebenso lassen die in dieser Arbeit erzielten *in vitro*-Ergebnisse diesen Rückschluss zu. Daher wurde der Einfluss von FoxM1 auf den Wnt-Signalweg bei Medulloblastomen untersucht. Hierfür wurden Kulturen von isolierten murinen Medulloblastomen *ex vivo* angelegt und die Aktivität des Wnt-Signalwegs nach dem lentiviral vermittelten Knock-out von FoxM1 untersucht.

Basierend auf den Ergebnisse aus Kapitel 3.3.6, die *in vitro* erzielt wurden und vermuten lassen, dass FoxM1 eine mögliche Verbindung zwischen dem *sonic hedgehog*-Signalweg und dem Wnt-Signalweg darstellt, wurde diese Funktion *ex vivo* untersucht.

Zu diesem Zweck wurden Primärkulturen von P5-Mäusen nach Kapitel 2.6.2 angelegt. Medulloblastomzellen des Genotyps *Foxm1^{fl/+}Smom2^{fl/+}* bzw. *Foxm1^{fl/fl}Smom2^{fl/+}* wurden kultiviert und mit Lentiviren infiziert. Diese Lentiviren führen zur einer Transforma-

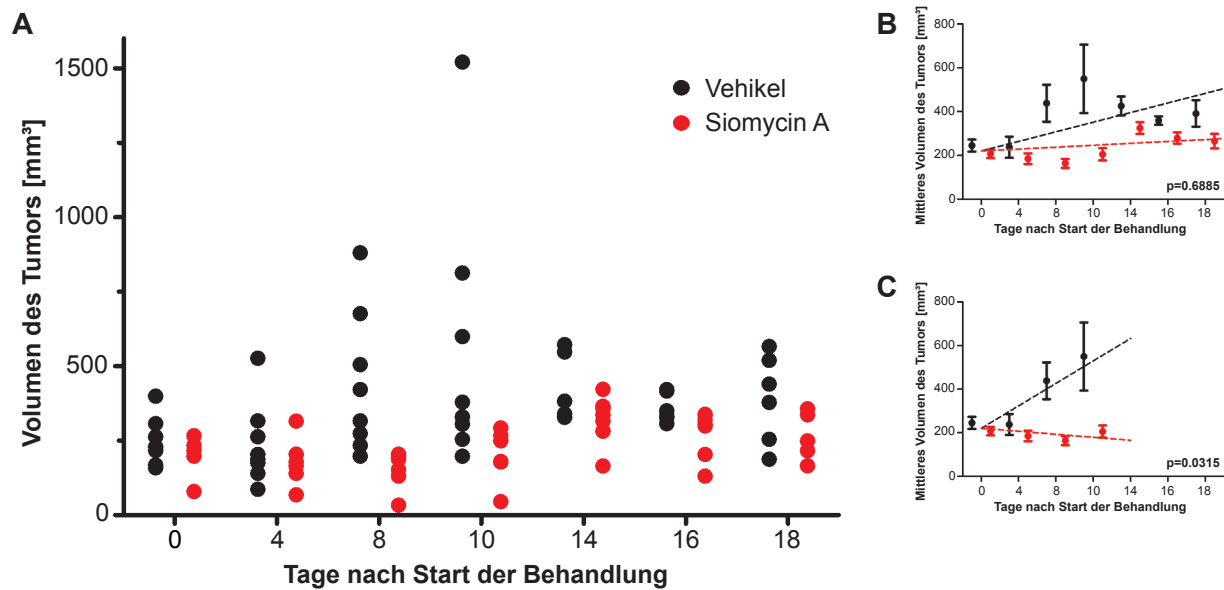


Abbildung 3.12: **Tumorentwicklung im Xenograftmodell nach Gabe von Siomycin** **A.** NMRI-nu/nu-Mäusen wurden humane Medulloblastomzellen subkutan implantiert und bei einer erreichten Tumorgöße von 200 mm³ mit der Behandlung mit Siomycin A begonnen. **(A)** zeigt die einzelnen gemessenen Tumorgößen in der Kontrollgruppe (n=8, schwarz) und in der mit Siomycin A behandelten Gruppe (n=8, rot) über den gesamten Zeitraum von 18 Tagen. **(B)** Aus den Daten von (A) wurden die Regressionsgeraden der beiden Gruppen berechnet und verglichen. Beide Wachstumskurven unterscheiden sich nicht signifikant, $p=0.6885$. **(C)** Werden die Regressionsgeraden nur aus den Meßwerten bis zum Behandlungstag 10 berechnet, inhibiert Siomycin A signifikant das Wachstum der Medulloblastom-Xenograften, $p=0.0315$.

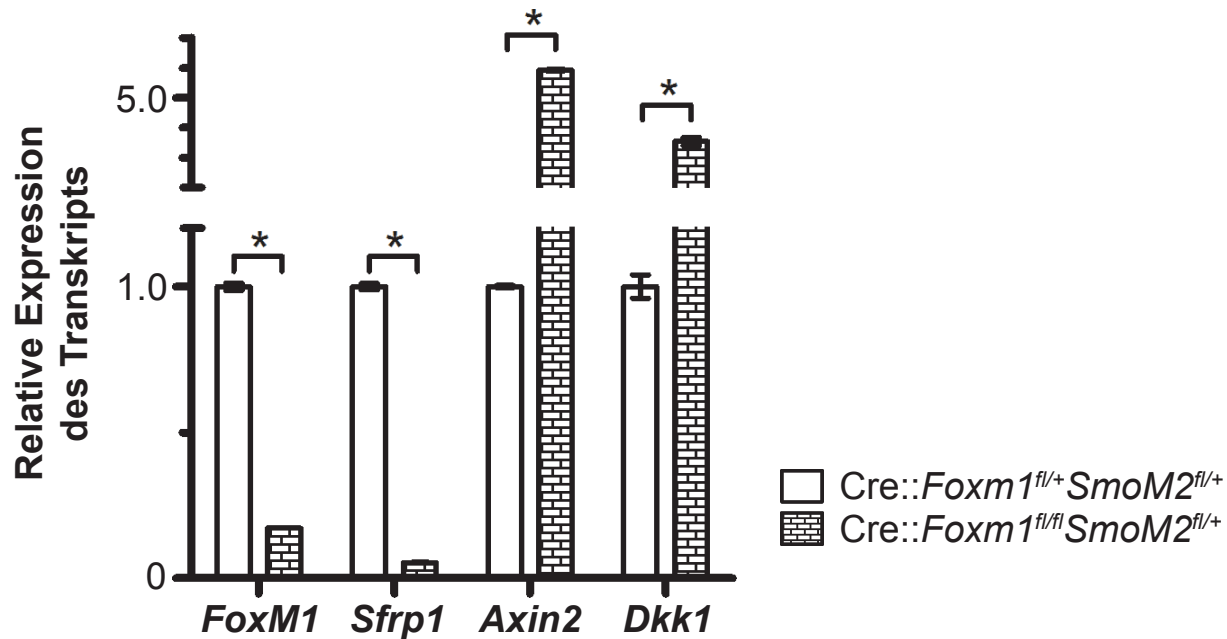


Abbildung 3.13: **Der Verlust von FoxM1 im murinen Medulloblastom führt zur Aktivierung des Wnt-Signalwegs.** Murine Tumorzellen wurden mit Cre-Rekombinase-exprimierenden Lentiviren infiziert und es wurden die Expressionsniveaus verschiedener Zielproteine des Wnt-Signalwegs mittels qRT-PCR gemessen. Der homozygote Verlust von *Foxm1* führte zu einer Abnahme der Expression von FoxM1-mRNA auf 0.17 der heterozygoten Kontrollkondition. Ebenso sank die Expression von *Sfrp1* auf 0.05 ab. Die Expression der Wnt-Zielgene *Axin2* und *DKK1* erhöhte sich auf das 5.9- und 3.5-fache bei dem homozygoten Verlust von FoxM1; *, $p < 0.05$.

tion der infizierten Zellen zu Medulloblastomzellen über die konstitutive Aktivierung des sonic hedgehog-Signalwegs. Gleichzeitig kann der Effekt des homozygoten Knock-out von FoxM1 in den Tumorzellen mit der Kontrolle, dem heterozygoten Knock-out von FoxM1, verglichen werden.

Da mehrere Gene gleichzeitig untersucht wurden, wurde das jeweilige Expressionsniveau des Gens mit der quantitativen Real-time PCR (qRT-PCR) bestimmt (Abbildung 3.13). Als Kontrolle des erfolgreichen Knock-out von *Foxm1* wurde das Expressionslevel von FoxM1 der Tumorzellen ermittelt. Tumorzellen mit einem homozygoten Knock-out von FoxM1 (Cre::Foxm1^{fl/fl}SmoM2^{fl/+}) exprimierten signifikant weniger *Foxm1* mRNA als Tumorzellen mit heterozygotem Knock-out (Cre::Foxm1^{fl/+}SmoM2^{fl/+}, 0.17, $p < 0.05$). Als mögliches down-stream target von FoxM1 wurde die Expression von *Sfrp1*, einem Inhibitor des Wnt-Signalwegs, untersucht. *In silico* Analysen ergaben, dass sich in der -10kb-Promotorregion von *Sfrp1* eine mögliche Bindestelle von FoxM1 befindet. Die Expression von *Sfrp1* sank nach dem homozygoten Knock-out von *Foxm1* auf 0.05 der Kontrollexpression signifikant ab ($p < 0.05$). Für den Nachweis der Aktivierung des Wnt-Signalwegs wurde das Expressionsniveau zweier verschiedener Zielgene des Wnt-Signalwegs analysiert. Beide

Gene wurden nach dem Knock-out von *Foxm1* durch die Tumorzellen stark überexprimiert (*Axin2* 5.92-fach und *Dkk1* 3.53-fach, alle $p < 0.05$).

Kapitel 4

Diskussion

4.1 Bedeutung von FoxM1 als prognostischer Marker

Die vorliegende Arbeit konnte zeigen, dass FoxM1 vom humanen Medulloblastom stark exprimiert wird. Zudem konnte an einer kleinen Patientenkohorte von 43 Medulloblastom-merkrankten immunhistochemisch die prognostische Bedeutung des Expressionsniveaus von FoxM1 belegt werden. Dieser Befund konnte an einem unabhängigen Testset von 130 Medulloblastomen bestätigt werden. Hierbei wurden Expressionsdaten aus Microarray-Studien ausgewertet.

Außerdem wurde die funktionelle Bedeutung von FoxM1 sowohl *in vitro* als auch *in vivo* für das Medulloblastom analysiert. FoxM1 scheint eine wichtige Rolle für das Wachstum des Tumors zu haben und kann somit als mögliches Zielprotein für die Therapie des Medulloblastoms dienen. Hierfür wurden erste Untersuchungen mit dem Thiazol Siomycin A durchgeführt, das einen spezifischen Inhibitor von FoxM1 darstellt.

Die Überlebensrate von Patienten mit Medulloblastom stellt sich sehr heterogen dar. Die Fünf-Jahres-Überlebensrate von Neugeborenen mit metastasierendem Medulloblastom liegt bei nur 20-40 %, bei Erwachsenen mit nicht-metastasierendem Medulloblastom dagegen bei über 80 % (Crawford et al., 2007). In der Literatur wird die Fünf-Jahres-Überlebensrate unabhängig von Alter und Metastasenstatus des Patienten mit ungefähr 66 % angegeben (Gatta et al., 2009). Allerdings ist anzumerken, dass das Medulloblastom von der *World Health Organisation* als Grad IV-Tumor klassifiziert ist (Louis et al., 2007), und somit die Therapie auch Radio- und multimodale Chemotherapie umfasst (Evans et al., 1990; Taylor et al., 2003; Weiss and Hess, 1999). Das führt einerseits idealerweise zum Überleben des Patienten, kann andererseits aber auch schwere Nebenwirkungen verursachen (Duffner et al., 1993). Besonders Patienten mit weniger aggressiv wachsenden Medulloblastomen leiden dann unter einer „Übertherapie“ (Taillibert et al., 2004). Als „Übertherapie“ wird eine Therapie dann bezeichnet, „...wenn es unwahrscheinlich ist, dass durch sie im Vergleich zur Nichttherapie oder einer anderen Therapie eine Lebensverlängerung und/oder Verbesserung der Lebensqualität erzielt werden kann.“ (Wedding et al., 2008).

Die Identifizierung von weniger aggressiven Medulloblastomen und somit eine gezielte

Therapieplanung ist daher eine wichtige Aufgabe der klinischen Forschung. Erste Erfolge konnten darin bereits erzielt werden. So konnten Cho et al. (2010) aggressive Medulloblastome anhand des Transkriptoms des Tumors sicher identifizieren. Allerdings beruhen diese Ergebnisse auf globalen Genexpressionsstudien, und die Anzahl prognostischer Marker, die schnell und zuverlässig an FFPE-Proben (formalinfixierte und in Paraffin eingebettete Biopsien) durchgeführt werden können, ist sehr beschränkt. Beispielsweise ist die nukleäre Lokalisation von β -Catenin ein bekannter Marker für Medulloblastome (Ellison, 2010). Außerdem wird der allgemeine Proliferationsmarker Ki67 für die Einschätzung des Tumors benutzt (Ramachandran et al., 2002; Deckert et al., 1989; Moschovi et al., 2011). Die Verwendung von Ki67 hat allerdings Einschränkungen. Nodulare Medulloblastome zeigen beispielsweise eine Expression von Ki67 hauptsächlich im Internodularraum und nicht im gesamten Tumor (Suresh et al., 2004). Außerdem wurde bei jungen Frauen nachgewiesen, dass der Proliferationsindex von Ki67 vom Zyklus abhängig ist (Garcia y Narvaiza et al., 2008).

Bisher sind die Möglichkeiten einer immunhistochemischen Einschätzung von Medulloblastomen an FFPE-Proben unbefriedigend. Standardmäßig werden in der Klinik Tumorbiospien durchgeführt und das gewonnene Gewebe zu FFPE-Proben prozessiert. Die Entwicklung und Evaluierung von prognostischen Markern, die an FFPE-Proben nachweisbar sind, bieten ein großes Potential.

Der immunhistochemische Nachweis von FoxM1 konnte an FFPE-Proben von Medulloblastomen schnell und zuverlässig durchgeführt werden. Die Fünf-Jahres-Überlebensrate der untersuchten Patientenkohorte, die insgesamt 41 Fälle beinhaltete, lag bei circa 60 %. Dieser Wert stimmt gut mit der Fünf-Jahres-Überlebensrate von Patienten mit Medulloblastom, der in der Literatur beschrieben mit circa 66 % angegeben wird, überein (Gatta et al., 2009).

Wir konnten in der vorliegenden Arbeit an einer Patientenkohorte nachweisen, dass FoxM1 schnell, einfach und zuverlässig an FFPE-Proben nachweisbar ist. Ebenso korreliert das Expressionsniveau von FoxM1 mit dem Überleben des Patienten und kann somit zur Einschätzung der Aggressivität des Tumors verwendet werden.

Die prognostische Bedeutung des Labelingindex bzw. des Expressionsniveaus von FoxM1 konnte an zwei unterschiedlichen und unabhängigen Patientenkohorten nachgewiesen werden. Die erzielten Ergebnisse decken sich mit den Befunden an anderen Tumoren. FoxM1 wurde als prognostischer Marker bei Gliomen (Liu et al., 2006), Lungenkrebs (Yang et al., 2009) und malignen Nervenscheidentumoren (Yu et al., 2011) beschrieben. Die Expression von FoxM1 in beiden untersuchten Patientenkohorten war sowohl vom Alter als auch vom Geschlecht des Patienten unabhängig.

Zusammenfassend lässt sich die Schlussfolgerung ziehen, dass FoxM1 somit einen interessanten Kandidaten darstellt, der als prognostischer Marker an FFPE-Proben zuverlässig nachweisbar ist. Im Medulloblastom spiegelt sich im Expressionsniveau von FoxM1 die Aggressivität des Tumors und somit die Überlebenswahrscheinlichkeit des Patienten wieder. Die Ergebnisse dieser Arbeit sollten in einem größeren Patientenkollektiv validiert werden, um das Potential von FoxM1 als Marker für die Therapieplanung in der Klinik besser einschätzen zu können.

4.2 Zelluläre Funktion von FoxM1

Schüller et al. (2007) konnten an unterschiedlichen Mausmodellen nachweisen, dass sich das Kleinhirn trotz des Fehlens von FoxM1 normal entwickelt. Ebenso war ein Befund ihrer Arbeit, dass die Körnervorläuferzellen des Kleinhirns auch ohne FoxM1 normal proliferieren (Schüller et al., 2007). Im Gegensatz dazu konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass das Fehlen von FoxM1 bei Medulloblastomzellen zu einem Proliferationsstopp und zur Induktion von Caspase-abhängiger Apoptose führt.

Die Entwicklung von Tumoren wird auf ungleiche Regulation von Signalen, die für Zellwachstum und -tod verantwortlich sind, zurückgeführt (Evan and Vousden, 2001). Ein wichtiger Punkt zur Bekämpfung der Tumorzellen ist die Induktion des programmierten Zelltods, der Apoptose (Jacobson et al., 1997; Thompson, 1995).

Die spezifische Inhibierung von FoxM1 mittels shRNA führte zur Induktion von Caspase-abhängigen Apoptose. Diese Beobachtungen lassen vermuten, dass für das Medulloblastom die Expression von FoxM1 essentiell ist, da in Kontrollzellen der Knock-down von FoxM1 keine funktionelle Wirkung hatte. Als Kontrollzellen wurden HEK293T-Zellen verwendet, transformierte humane embryonale Nierenzellen (Shein and Enders, 1962).

Für die Behandlung von Patienten mit spezifischen Inhibitoren von FoxM1 stellt die alleinige Wirkung auf transformierte Tumorzellen eine wichtige Voraussetzung dar. In der normalen Kleinhirnentwicklung wird das Fehlen von FoxM1 durch andere Faktoren kompensiert (Schüller et al., 2007). Somit ist diese Voraussetzung erfüllt.

Ein Kandidat, der die Expression von FoxM1 spezifisch inhibieren kann, ist das Thiazol Siomycin A (Radhakrishnan et al., 2006). Seit 2007 wird es als potentiell Therapeutikum für Patienten mit Tumoren, die in hohem Maße FoxM1 exprimieren, diskutiert (Adami and Ye, 2007). Siomycin A wurde in einem humanen Brustkrebs-Xenograftmodell erfolgreich eingesetzt und könnte auch *in vivo* eine potentielle Wirkung gegen Brustkrebs besitzen (Halasi et al., 2010).

In der vorliegenden Arbeit wurde die Wirksamkeit bisher verwendeter Chemotherapeutika an Medulloblastomzelllinien untersucht. Sowohl Vincristin als auch Cisplatin konnten erfolgreich die Proliferation der Zelllinien inhibieren. Die Wirksamkeit beider Chemotherapeutika war unabhängig vom Proteinlevel von FoxM1. Somit stellt FoxM1 somit ein neues Ziel der Therapie dar. Medulloblastome können schnell Resistenzen gegen Chemotherapeutika entwickeln (Yauch et al., 2009). Beispielsweise konnte ein Inhibitor von Smo, GDC-0449, erfolgreich bei einem Patienten mit Medulloblastom eingesetzt werden (Rudin et al., 2009). Nach kurzer Zeit trat bei diesem Patienten jedoch ein resistentes Tumorrezidiv auf, was letztendlich zum Tod des Patienten führte (Metcalf and de Sauvage, 2011). Die Resistenz des Tumors gegen das Chemotherapeutikum war durch eine Punktmutation des Zielmoleküls bedingt (Metcalf and de Sauvage, 2011). Dies zeigt die Notwendigkeit einer Kombinationstherapie mit möglichst unterschiedlichen Zielmolekülen auf. Bei der Verwendung unterschiedlicher Ziele in der Therapie wird die Wahrscheinlichkeit einer Resistenz gesenkt.

FoxM1 ist an einer Vielzahl biologischer Prozesse beteiligt (Koo et al., 2012). So ist FoxM1 beispielsweise ein klassischer Regulator des Zellzyklus (Laoukili et al., 2005; Wang

et al., 2005; Wierstra and Alves, 2007b). Es ist auch an der Bildung von Oberflächenproteinen beteiligt (Kalin et al., 2008) und ist wichtig bei der Differenzierung und bei DNA-Reparaturprozessen (Wang et al., 2009a). Durch die Regulation von c-Jun-N-terminal-Kinase (JNK1) wirkt sich FoxM1 auf die Migration aus (Wang et al., 2008a). Es ist ebenso bei der Angiogenese involviert (Wang et al., 2007). Es ist auch direkt am Östrogen-Signalweg bei Brustkrebs beteiligt (Millour et al., 2010). Desweiteren kann FoxM1 durch die direkte Regulation von Cyclooxygenase 2 (Cox2) die Prostaglandin-Synthese und Inflamationsprozesse beeinflussen (Wang et al., 2008b). Auch an Rekrutierungsprozessen von Makrophagen ist es beteiligt (Ren et al., 2010). Seine Überexpression führt zur Promoter-Hypermethylierung von Tumorsuppressorgenen (Teh et al., 2012).

In Medulloblastomzelllinien konnte im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden, dass FoxM1 wichtig für die Ausbildung eines bipolaren Spindelapparats ist. Wurde FoxM1 in den Zellen erfolgreich inhibiert, erfolgte in der M-Phase eine abnormale Chromosomenverteilung auf die Tochterzellen. Dies war in einer fehlerhaften Ausbildung des Spindelapparats begründet. Es folgte ein Zellzyklusarrest in der M-Phase, da eine korrekte Chromatidverteilung nicht stattfinden konnte. Der Arrest in der M-Phase konnte durch eine nucleäre Lokalisation und eine Überexprimierung von Cyclin B1 charakterisiert werden (Brandeis and Hunt, 1996; Wolf et al., 2006). Dieser Arrest führte zur Induktion der „caspase-dependent mitotic catastrophe“, die zum Tod der Zelle führt (Vakifahmetoglu et al., 2008).

Neben der Inhibierung von FoxM1 durch Siomycin A konnte auch durch den Knock-out mittels siRNA eine Aktivierung des Wnt-Signalwegs erzielt werden. Neueste Forschungsergebnisse lassen vermuten, dass FoxM1 für die Aktivierung des Wnt-Signalwegs in Tumoren eine Rolle spielt (Abla et al., 2012; Balli et al., 2011; Zhang et al., 2011). Dies stellt einen wichtigen Befund dar, da die Aktivierung des Wnt-Signalwegs in Körnervorläuferzellen, die eine Zellpopulation darstellen, aus der das Medulloblastom hervorgehen kann (Grammel et al., 2012; Schüller et al., 2008), eine proliferationshemmende Wirkung hat (Lorenz et al., 2011). Die proliferationshemmende Wirkung durch den Verlust von FoxM1 konnte auch in Medulloblastomzelllinien nachgewiesen werden.

4.3 Bedeutung von FoxM1 für das Medulloblastom *in vivo*

Für das humane Medulloblastom existieren verschiedene Mausmodelle, die auf fehlregulierten Signalwegen basieren (Corcoran and Scott, 2001; Gibson et al., 2010; Hallahan et al., 2004; Mao et al., 2006; Goodrich et al., 1997). In der vorliegenden Arbeit wurde das *sonic hedgehog*-abhängige Medulloblastom *in vivo* untersucht. Dieses umfasst circa ein Viertel aller Medulloblastome und stellt den am besten untersuchten Subtyp dar (Hatten and Roussel, 2011).

In dieser Arbeit wurde das Cre-lox-System zur Erzeugung des Tumors und auch zum Knock-out von FoxM1 benutzt. Der Mechanismus wurde in der Bakteriophage P1 entdeckt und beschrieben (Sauer and Henderson, 1988; Sternberg et al., 1981). Seitdem wird das

Cre-lox-System verwendet, um das Genom von Säugerzelllinien, Hefen, Pflanzen, Mäusen und anderen Organismen zu manipulieren (Araki et al., 1997)

In unseren Experimenten wurden ein transgenes Mausmodell erzeugt, das eine maligne Transformation bestimmter Zellen in Kleinhirn und einen gleichzeitigen konditionellen Knock-out von FoxM1 innerhalb dieser Zellen ermöglichte. Wir konnten zeigen, dass die Expression von FoxM1 essentiell für die Tumorentstehung und -progression ist. Wir versuchten einen konditionalen homozygoten Knock-out von FoxM1 in den transformierten Zellen zu induzieren und konnten zeigen, dass sich trotzdem Medulloblastome entwickeln. Außerdem konnte der mittlere Zeitpunkt der Tumorentstehung nicht beeinflusst werden. Die Gesamtüberlebenszeit der Mäuse unterschied sich ebenfalls nicht von der Gesamtüberlebenszeit der Kontrolltiere. Nach dem Tod der Tiere konnte eine unvollständige Rekombination von FoxM1 in den Medulloblastomen nachgewiesen werden und die Tumoren exprimierten weiterhin hohe Level von FoxM1.

Unvollständige Rekombination durch die Cre-Rekombinase ist ein bekanntes Problem des Cre-lox-Systems (Pan et al., 2011; Sansom et al., 2005; Tremml et al., 1999). Unser experimentelles Design verlangte einen vollständigen Knock-out von FoxM1 um einen Effekt auf das Tumorwachstum zu erzielen. Da das Cre-lox-System diese Möglichkeit nicht bieten konnte, wurde FoxM1 akut aus dem Tumor entfernt. Hierfür wurde den Mäusen mit Medulloblastom an P14 ein Lentivirus injiziert, der für einen shRNA-vermittelten Knock-down für FoxM1 kodiert. Die Behandlung von Tumoren mit shRNA bietet den Vorteil, dass ausgewählte Onkogene gezielt ausgeschaltet werden können (Hannon and Rossi, 2004). Das Einbringen von Lentiviren in das Hirn von Mäusen wurde bereits erfolgreich beschrieben (Gibson and Ma, 2011; Pilpel et al., 2009).

Da aus technischen Gründen die Quantifizierung der infizierten Zellen *in vivo* nicht möglich war (fehlende Markersequenz der shRNA, beispielsweise ein fluoreszenter Marker), wurde die Effektivität des Knock-downs von FoxM1 in einer murinen Medulloblastomzelllinie vor Applikation *in vivo* überprüft (Grasselli et al., 2011). Der akute Knock-down von FoxM1 in unserem Mausmodell des Medulloblastoms konnte mit einer spezifischen shRNA-Sequenz die Gesamtüberlebenszeit der Mäuse verlängern. Eine erfolgreiche Verlängerung der Überlebenszeit konnte dabei nur mit einem einzigen Konstrukt erzielt werden. Dies lag an funktionellen Problemen der shRNA-Sequenzen. Die Sequenzen wurden *in silico* generiert, kloniert, und es wurde die Effektivität *in vitro* bestimmt (Yuan et al., 2004). Hierbei zeigte sich, dass nur eine Sequenz im MTT-Assay wirksam war. Diese Sequenz war auch *in vivo* in der Lage, Einfluss auf die Tumorprogression zu nehmen. Die anderen untersuchten Sequenzen hatten *in vitro* keinen Effekt auf die Proliferationsrate der Tumorzellen.

Das Thiazol Siomycin A inhibiert spezifisch den Transkriptionsfaktor FoxM1 (Radhakrishnan et al., 2006). Eine Applikation *in vivo* wurde bereits beschrieben. Hierbei wurde in einem Xenograftmodell des Brustkrebs die Proliferation des Tumors inhibiert (Halasi et al., 2010). Bei Verwendung einer Medulloblastomzelllinie mit NMRI-nu/nu-Mäusen konnte durch Gabe von Siomycin A die Tumorprogression ebenfalls verlangsamt werden. Die Inhibierung des Wachstums der Tumorzellen erfolgte allerdings nur innerhalb der ersten zehn Tage. Anschließend konnte kein Unterschied zwischen der Kontrollgruppe und der Siomycin A-Gruppe beobachtet werden. Es ist anzumerken, dass Xenograftmodelle nur un-

vollständige Tumormodelle darstellen und im Allgemeinen transgenen Modellen unterlegen sind (Becher and Holland, 2006; Sharpless and Depinho, 2006). Daher sind prognostische Aussagen über die Wirksamkeit der darin verwendeten Substanzen nur schwer zu treffen (Fomchenko and Holland, 2006).

Die Verwendung von Siomycin A in unserem transgenen Tiermodell war aus folgendem Grund nicht möglich. Mäuse des Genotyps *SmoM2^{fl/+}* haben je nach spezieller Verwendung der Cre-Rekombinase unterschiedliche Überlebenszeiten. Werden die transgenen Mäuse mit einer Mauslinie verpaart, die die Cre-Rekombinase unter einem hGFAP-Promotor exprimiert, liegt die mittlere Überlebenszeit der transgenen Nachkommen bei 13 Tagen. Das heißt, die Mäuse, die ein Medulloblastom entwickeln, versterben im Mittel schon im Jugendalter. Bei Verwendung eines anderen Promotors, unter dem die Cre-Rekombinase exprimiert wird (Math1), kann die mittlere Überlebenszeit der transgenen Nachkommen auf bis zu 28 Tagen gesteigert werden (Schüller et al., 2008). Da jedoch noch keine Erfahrungen für die Anwendung von Siomycin A bei jungen Mäusen vorlagen, wurde auf die Applikation von Siomycin A bei Jungtieren verzichtet, und es sollten nur erwachsene Tiere (älter als 28 Tage) therapiert werden.

Da der Knock-out von FoxM1 *in vitro* zu einer Aktivierung des Wnt-Signalwegs führt, wurde diese Beobachtung an *ex vivo*-Kulturen überprüft. Es wurden cerebelläre Kulturen aus P5-Mäusen angelegt, die mit Lentiviren, die die Expression einer Cre-Rekombinase vermitteln, infiziert wurden. Die Zellen wurden durch die Aktivierung des *sonic hedgehog*-Signalwegs in Medulloblastomzellen transformiert. Die Zellen wurden geerntet und das Transkriptom isoliert. Der Vergleich der Expression der untersuchten Genen erfolgte zwischen *Foxm1^{fl/+}SmoM2^{fl/+}*- und *Foxm1^{fl/fl}SmoM2^{fl/+}*-Kulturen. Die Expression von *Foxm1* wurde überprüft und es konnte ein erfolgreicher Knock-down bei den homozygoten (*Foxm1^{fl/fl}*) Kulturen festgestellt werden. Die Aktivität des Wnt-Signalwegs wurde durch die Expressionsrate von *Dkk1* und *Axin2*, zwei Zielgenen des Signalwegs (Yan et al., 2001; Chamorro et al., 2005; González-Sancho et al., 2005; Jho et al., 2002; Lustig et al., 2002; Niida et al., 2004), kontrolliert. Beide Zielgene waren nach einem Knock-down von FoxM1 stark überexprimiert.

Eine mögliche Verbindung von FoxM1 und dem Wnt-Signalweg kann über Sfrp1 (*Secreted frizzled-related protein 1*) erfolgen. Die Expression dieses Proteins, das ein bekannter Inhibitor des Wnt-Signalwegs ist (Chong et al., 2002; Jones and Jomary, 2002), war nach dem Knock-down von FoxM1 stark reduziert. *In silico*-Analysen ergaben, dass sich in der Promotor-Region von Sfrp1 ein Bindemotiv für FoxM1 befindet und somit FoxM1 direkt die Expression von Sfrp1 induzieren kann. Allerdings wurden diese Befunde noch nicht experimentell überprüft und stellen somit vorläufige Ergebnisse dar.

Die therapeutische Bedeutung dieses Befundes liegt in der Tatsache begründet, dass bereits potente Agonisten des Wnt-Signalwegs in der Klinik verwendet werden. Beispielsweise wird Lithium, ein bekannter Aktivator des Wnt-Signalwegs (Jope, 2003), seit über 100 Jahren für die Therapie von manisch-depressiven Patienten verwendet (Vacheron-Trystram et al., 2004). Lithium bewirkt dabei über die Inhibierung von GSK-3 β eine Aktivierung des Wnt-Signalwegs (Jope, 2003; Sutton et al., 2007). Die Anwendung von Lithium für die Therapie des Medulloblastoms wäre denkbar, da bereits bekannt ist, dass Lithium die

Blut-Hirn-Schranke passiert und innerhalb des Gehirns wirksam ist (Angelucci et al., 2003, 2004). Dabei ist Lithium nicht mutagen (Weiner et al., 1990). Lithium wird bereits zur Therapie bei bipolarer Störung verwendet (Bauer et al., 2002; Dunner, 2003).

GSK-3 β stellt ein interessantes Ziel für die Behandlung von neurodegenerativen Erkrankungen dar (Eldar-Finkelman, 2002; Gould et al., 2004). Bei Alzheimer liegt oft eine erhöhte Expressionsrate und Aktivität von GSK-3 β vor (Bhat et al., 2004). GSK-3 β phosphoryliert unter anderem Tau (Sang et al., 2001). Hyperphosphoryliertes Tau bildet den Hauptbestandteil der neurofibrillären *tangles* bei Alzheimer (Planel et al., 2001). Lithium kann einerseits über die Hemmung von GSK-3 β die Bildung der Ablagerungen verhindern (Stoothoff and Johnson, 2001). Andererseits stimuliert Lithium Proteinphosphatase 2A (PP2A), einem dephosphorylierendem Enzym (Goldbaum and Richter-Landsberg, 2002; Tsuji et al., 2003). Außerdem fördert Lithium die Spaltung von Tau-Protein (Rametti et al., 2004). Die Produktion von β -Amyloid-Peptid (APP) kann durch Lithium ebenfalls inhibiert werden (Su et al., 2004).

Die Verwendung von Lithium als Therapiemöglichkeit bei anderen neurodegenerativen Erkrankungen wird ebenfalls diskutiert. So soll Lithium bei sporadischer Parkinson-Erkrankung (Chen et al., 2004), bei Chorea Huntington (Sarkar et al., 2008; Senatorov et al., 2004), bei Alkohol-induzierter Neurodegeneration (Chakraborty et al., 2008) und bei Amyotropher Lateralsklerose (Fornai et al., 2008) helfen. Bei Prionen-vermittelter Neurodegeneration konnte *in vitro* nachgewiesen werden, dass Lithium therapeutisch wirksam ist (Pérez et al., 2003).

4.4 Ausblick

Das Medulloblastom ist der häufigste maligne Gehirntumor bei Kindern. Es versterben noch immer viele Patienten an dem Tumor und die Kausaltherapie hat oft schwere Nebenwirkungen für den Patienten zur Folge. Daher ist es notwendig neue Therapieformen zu entwickeln. Im Rahmen dieser Arbeit konnten wir zeigen, dass der Transkriptionsfaktor FoxM1 ein unabhängiger prognostischer Marker ist, der es in der Klinik ermöglichen könnte, eine differenziertere Therapie des Patienten zu planen. Zudem konnten wir nachweisen, dass FoxM1 essentiell für das Wachstum von Medulloblastomzellen *in vitro* als auch *in vivo* ist. FoxM1 stellt somit ein interessantes therapeutisches Ziel dar.

Das Thiazol Siomycin A erwies sich als potenter Inhibitor von FoxM1 *in vitro* als auch *in vivo*. Die Behandlung von Medulloblastomzellen mit Siomycin A führte zu einer Herunterregulation von FoxM1 und konnte das Wachstum der Tumorzellen blockieren.

Die vorliegenden Ergebnisse können als Grundlage zukünftiger klinischer Studien dienen. Diese können in größeren Patientenkohorten einerseits die Potenz von FoxM1 als prognostischen Marker für Medulloblastome prüfen. Andererseits können Studien durchgeführt werden, die aufgrund der Expression von FoxM1 Medulloblastompatienten in verschiedene Behandlungsgruppen einteilen.

Die Behandlung des Medulloblastoms mit Siomycin A sollte an transgenen Tiermodellen des Medulloblastoms durchgeführt werden. Diese ermöglichen präzisere Aussagen über

die Wirksamkeit von Siomycin A auf Medulloblastome. Diese Grundlagen könnten eines Tages dazu führen, dass Medulloblastompatienten unter anderem mit Siomycin A behandelt werden.

Die molekulare Verbindung von FoxM1 mit dem Wnt-Signalweg stellt eine interessante Beobachtung dar. Die endgültige Verifizierung des Ergebnisses, dass FoxM1 in der Promotorregion von *Sfrp1* binden kann, kann durch Chromatinimmunopräzipitationsversuche (ChIPs) nachgewiesen werden, die im Rahmen dieser Arbeit nicht durchgeführt wurden. Die physiologische Bedeutung der Wnt-Aktivierung für das Medulloblastom wird kontrovers diskutiert. Zumindest in einem Teil der Medulloblastome (*sonic hedgehog*-abhängige Medulloblastome) hemmt die Aktivierung des Wnt-Signalwegs die Proliferation der Tumorzellen. Allerdings sind auch Medulloblastome bekannt, die durch eine Aktivierung des Wnt-Signalwegs charakterisiert sind.

Es bleibt abzuwarten, inwieweit eine Therapie des Medulloblastoms über die Aktivierung des Wnt-Signalwegs erfolgen kann. Dafür würden allerdings schon klinisch erprobte Substanzen (zum Beispiel Lithium) zur Verfügung stehen.

Anhang A

Klinische Details der untersuchten Tumoren

Tabelle A.1: Histologie, FoxM1 Expression und klinische Details der untersuchten Medulloblastome.

#	Histologischer Subtype	Geschlecht	Alter [Jahre]	Follow-up [Monate]	Status	FoxM1 ⁺ Tumorzellen	Ort
1	Klassisch	F	9.7	75.6	DOD	7.80	Hannover
2	Extensiv nodular	F	2.9	78.4	NED	11.50	Göttingen
3	Desmoplastisch	F	25.5	88.3	NED	6.90	München
4	Desmoplastisch	M	22.8	47.3	NED	6.46	München
5	Desmoplastisch	F	30.7	31.4	NED	9.19	München
6	Klassisch	M	9.3	59.2	NED	3.09	München
7	Klassisch	M	8.5	36.5	DOD	6.12	Göttingen
8	Klassisch	M	17.2	N/A		3.70	München
9	Desmoplastisch	F	30.5	51.3	NED	5.76	München
10	Desmoplastisch	F	1.6	66.9	NED	5.12	München
11	Klassisch	M	4.9	75.7	DOD	7.04	Göttingen
12	Desmoplastisch	F	26.5	53.0	NED	6.53	München
13	Desmoplastisch	M	7.5	14.2	DOD	15.80	Göttingen
14	Klassisch	M	6.2	22.2	DOD	18.60	Göttingen
15	Klassisch	M	22.3	35.3	NED	2.47	Göttingen
16	Klassisch	M	2.4	21.0	DOD	30.70	Göttingen
17	Extensiv nodular	F	2.2	175.6	NED	5.30	Münster
18	Klassisch	M	4.1	35.4	NED	5.26	Göttingen
19	Klassisch	M	10.6	46.6	NED	4.56	München
20	Klassisch	M	6.7	33.4	NED	6.22	Göttingen

#	Histologischer Subtype	Geschlecht	Alter [Jahre]	Follow-up [Monate]	Status	FoxM1 ⁺ Tumorzellen	Ort
21	Desmoplastisch	M	10.0	95.7	NED	10.33	Münster
22	Desmoplastisch	M	19.0	81.2	NED	5.17	München
23	Klassisch	F	7.9	59.2	NED	5.89	Göttingen
24	Klassisch	M	45.6	94.4	NED	2.44	München
25	Klassisch	M	36.6	N/A		2.90	München
26	Desmoplastisch	M	2.0	12.0	DOD	9.12	Bremen
27	Desmoplastisch	M	2.5	7.0	DOD	8.80	Bremen
28	N/A	F	38.8	29.1	NED	13.10	Unknown
29	Desmoplastisch	F	40.4	32.1	DOD	6.16	München
30	Klassisch	F	3.1	22.8	DOD	7.16	Hannover
31	Klassisch	F	10.5	35.0	DOD	8.68	München
32	Klassisch	M	7.4	93.6	NED	9.82	Göttingen
33	Klassisch	F	7.5	12.9	DOD	13.80	München
34	Desmoplastisch	f	14.3	45.9	NED	6.30	München
35	Anaplastic	F	29.0	32.2	DOD	10.33	Münster
36	Klassisch	M	3.7	138.0	NED	3.88	Bremen
37	Klassisch	F	1.8	15.6	DOD	9.80	Bremen
38	Klassisch	M	11.5	129.0	NED	7.84	Bremen
39	Klassisch	F	14.4	154.1	NED	7.00	Münster
40	Desmoplastisch	F	34.9	103.7	NED	3.36	München
41	Klassisch	F	2.4	17.0	DOD	3.60	unbekannt
42	Klassisch	M	6.2	90.9	DOD	8.26	München
43	Klassisch	F	0.6	12.7	DOD	19.80	unbekannt

Anhang B

Expression von FoxM1 in Bezug zur Histologie und Alter

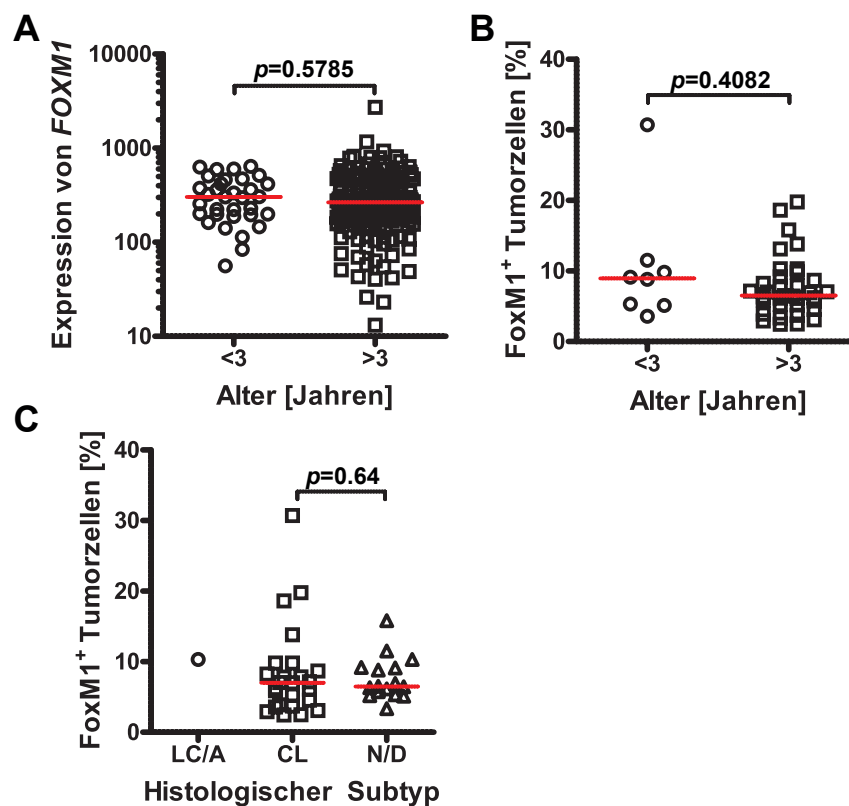


Abbildung B.1: Expression von FoxM1 im humanen Medulloblastom in Bezug zur Histologie und Alter. Das Expressionslevel von FoxM1 war weder in der Microarraygruppe ((A), $p=0.5785$), noch in der FFPE-Kohorte ((B), $p=0.4082$) vom Alter des Patienten abhängig. FoxM1 Protein wurde von histologischen Subtypen ähnlich stark exprimiert ((C), $p=0.6400$). LC/A=anaplastisch, CL=klassisch, N/D=nodular/desmoplastisch.

Autorenindex

- Aberle et al. (1997), 20, 79
Abla et al. (2012), 67, 79
Adami and Ye (2007), 66, 79
Alcedo et al. (1996), 20, 79
Alston et al. (2003), 16, 79
Altman and Bayer (1996), 18, 79
Amit et al. (2002), 18, 79
Angelucci et al. (2003), 70, 79
Angelucci et al. (2004), 70, 80
Araki et al. (1997), 68, 80
Bai et al. (2002), 18, 80
Bailey and Cushing (1925), 12, 80
Bale et al. (1998), 15, 80
Balli et al. (2011), 60, 67, 80
Bauer et al. (2002), 70, 80
Becher and Holland (2006), 69, 80
Behrens et al. (1998), 20, 80
Benayoun et al. (2009), 22, 80
Benayoun et al. (2011), 22, 81
Bhanot et al. (1996), 20, 81
Bhat et al. (2004), 70, 81
Brandeis and Hunt (1996), 67, 81
Brugières et al. (2010), 15, 81
Caldwell et al. (2010), 22, 81
Calnan and Brunet (2008), 22, 81
Carlsson and Mahlapuu (2002), 22, 81
Castedo et al. (2004), 46, 81
Chakraborty et al. (2008), 70, 81
Chamorro et al. (2005), 20, 69, 81
Chandran et al. (2007), 24, 81
Chen and Struhl (1996), 17, 82
Chen et al. (2004), 70, 81
Chiang et al. (1996), 18, 82
Cho et al. (2010), 13, 15, 27, 36, 37, 39, 65, 82
Chomczynski (1993), 29, 82
Chong et al. (2002), 69, 82
Clark et al. (1993), 22, 82
Clifford et al. (2006), 14, 15, 82
Corbit et al. (2005), 18, 82
Corcoran and Scott (2001), 20, 67, 82
Costa (2005), 24, 82
Crawford et al. (2007), 12, 64, 82
Dai et al. (2007), 24, 82
Dai et al. (2010), 24, 83
Dann et al. (2001), 20, 83
Deckert et al. (1989), 65, 83
Duffner et al. (1993), 17, 64, 83
Dunner (2003), 70, 83
Eberhart (2007), 12, 83
Echelard et al. (1993), 18, 83
Eldar-Finkelman (2002), 70, 83
Ellison et al. (2011), 15, 83
Ellison (2010), 19, 65, 83
Evan and Vousden (2001), 66, 83
Evans et al. (1990), 17, 64, 83
Fairbanks et al. (1971), 30, 84
Farwell and Flannery (1984), 12, 84
Fattet et al. (2009), 13, 14, 84
Fomchenko and Holland (2006), 69, 84
Fornai et al. (2008), 70, 84
Francis et al. (2009), 24, 84
Garcia y Narvaiza et al. (2008), 65, 84
Gatta et al. (2009), 12, 64, 65, 84
Gerdes (1990), 37, 84
Gibson and Ma (2011), 68, 84
Gibson et al. (2010), 13, 16, 20, 21, 67, 84
Gilbertson and Ellison (2008), 13, 85
Gilbertson (2004), 12, 39, 85
Goldbaum and Richter-Landsberg (2002), 70,

- 85
Goodrich et al. (1997), 18, 20, 67, 85
Gould et al. (2004), 70, 85
Grammel et al. (2012), 18, 21, 67, 85
Grasselli et al. (2011), 68, 85
Greer et al. (2007), 22, 85
Guan et al. (2011), 24, 85
Gusarova et al. (2007), 24, 85
Hahn et al. (1996), 15, 18, 86
Halasi et al. (2010), 66, 68, 86
Hallahan et al. (2004), 20, 67, 86
Hamada et al. (1999), 20, 86
Hamilton et al. (1995), 18, 86
Hannenhalli and Kaestner (2009), 22, 86
Hannon and Rossi (2004), 68, 86
Harada et al. (1999), 15, 20, 21, 86
Hatten and Roussel (2011), 13–15, 18, 67, 86
He et al. (1998), 20, 86
Ho et al. (2010), 22, 86
Huangfu and Anderson (2006), 18, 87
Hughes et al. (1988), 17, 87
Itoh et al. (1998), 20, 87
Jacobson et al. (1997), 66, 87
Jenkins (2009), 50, 87
Jeong et al. (2004), 15, 87
Jho et al. (2002), 20, 69, 87
Jones and Jomary (2002), 69, 87
Jope (2003), 69, 87
Kaestner et al. (2000), 22, 87
Kalbfleisch and Prentice (1980), 37, 39, 87
Kalin et al. (2006), 24, 87
Kalin et al. (2008), 67, 87
Kalinichenko et al. (2004), 24, 25, 88
Kaplan and Meier (1958), 37, 54, 88
Kim et al. (2005), 23, 88
Kim et al. (2006), 24, 88
Kim et al. (2010), 50, 88
Koo et al. (2012), 66, 88
Kool et al. (2008), 13, 15, 88
Kortmann et al. (2000), 17, 88
Korver et al. (1997a), 22, 23, 88
Korver et al. (1997b), 22, 89
Laemmli (1970), 30, 89
Laoukili et al. (2005), 23, 24, 66, 89
Laoukili et al. (2007), 23, 24, 89
Li et al. (2003), 58, 89
Li et al. (2007), 22, 89
Lin et al. (2010), 24, 89
Liu et al. (2006), 24, 65, 89
Lorenz et al. (2011), 16, 67, 89
Louis et al. (2007), 24, 27, 64, 89
Lum and Beachy (2004), 18, 90
Lustig et al. (2002), 69, 90
Ma et al. (2005), 23, 90
Mao et al. (2006), 18, 20, 67, 90
Metcalf and de Sauvage (2011), 66, 90
Millour et al. (2010), 67, 90
Moschovi et al. (2011), 65, 90
Nakamura et al. (2004), 24, 90
Network (2011), 24, 90
Niida et al. (2004), 69, 91
Northcott et al. (2009), 14, 15, 91
Northcott et al. (2011a), 15, 91
Northcott et al. (2011b), 14, 15, 39, 91
Northcott et al. (2012), ix, xi, 91
Obama et al. (2005), 24, 91
Oliver et al. (2005), 18, 91
Packer et al. (1999), 17, 42, 91
Pan et al. (2011), 68, 91
Pastorino et al. (2009), 15, 92
Persson et al. (2002), 18, 92
Pietsch et al. (1997), 15, 92
Pilarsky et al. (2004), 24, 92
Pilpel et al. (2009), 68, 92
Planel et al. (2001), 70, 92
Polkinghorn and Tarbell (2007), 13, 92
Pomeroy et al. (2002), 14, 92
Portugal et al. (2010), 42, 92
Pérez et al. (2003), 70, 92
Radhakrishnan et al. (2006), 24, 25, 46, 66, 68, 93
Ramachandran et al. (2002), 65, 93
Rametti et al. (2004), 70, 93
Remke et al. (2011a), 14, 15, 93
Remke et al. (2011b), 15, 93
Ren et al. (2010), 67, 93

- Ribi et al. (2005), 12, 93
Rogers et al. (2009), 14, 15, 93
Rudin et al. (2009), 66, 93
Salic et al. (2000), 20, 93
Sang et al. (2001), 70, 94
Sansom et al. (2005), 68, 94
Sarkar et al. (2008), 70, 94
Sauer and Henderson (1988), 67, 94
Schwalbe et al. (2011), 15, 94
Schüller et al. (2007), 25, 31, 36, 42, 66, 94
Schüller et al. (2008), 12, 16, 18, 20, 25, 54, 67, 69, 94
Senatorov et al. (2004), 70, 94
Sharpless and Depinho (2006), 69, 94
Shein and Enders (1962), 66, 94
Slade et al. (2011), 15, 94
Sternberg et al. (1981), 67, 95
Stone et al. (1996), 17, 95
Stoothoff and Johnson (2001), 70, 95
Su et al. (2004), 70, 95
Subramaniam et al. (2011), 46, 95
Sun et al. (2011), 24, 95
Suresh et al. (2004), 65, 95
Sutton et al. (2007), 69, 95
Taillibert et al. (2004), 64, 95
Tait et al. (1990), 17, 95
Tan et al. (2006), 23, 96
Tan et al. (2007), 22, 23, 95
Tanaka et al. (2011), 52, 96
Tarbell et al. (1991), 17, 96
Taylor et al. (2000), 15, 96
Taylor et al. (2002), 15, 96
Taylor et al. (2003), 17, 64, 96
Taylor et al. (2012), 14–16, 18, 36, 96
Teh et al. (2002), 24, 96
Teh et al. (2012), 67, 96
Thompson et al. (2006), 14, 15, 97
Thompson (1995), 66, 96
Tolwinski and Wieschaus (2004), 20, 97
Tremml et al. (1999), 68, 97
Tseng et al. (2006), 52, 97
Tsuji et al. (2003), 70, 97
Ulloa et al. (2007), 50, 97
Vakifahmetoglu et al. (2008), 67, 97
Valtz et al. (1991), 12, 97
Walker and Wilne (2005), 12, 97
Wallace (1999), 18, 98
Wang et al. (2002), 23, 24, 42, 98
Wang et al. (2005), 23, 24, 66, 98
Wang et al. (2007), 67, 98
Wang et al. (2008a), 67, 98
Wang et al. (2008b), 67, 98
Wang et al. (2009a), 67, 98
Wang et al. (2009b), 18, 98
Wedding et al. (2008), 64, 98
Weigel et al. (1989), 22, 98
Weiner et al. (1990), 70, 99
Weiss and Hess (1999), 17, 64, 99
Westendorf et al. (1994), 22, 99
Wetmore et al. (2001), 20, 99
Whitfield et al. (2002), 24, 99
Whitfield et al. (2006), 24, 99
Wielenga et al. (1999), 20, 99
Wierstra and Alves (2006), 23, 99
Wierstra and Alves (2007a), 23, 99
Wierstra and Alves (2007b), 23, 67, 99
Wierstra and Alves (2007c), 23, 99
Wijgerde et al. (2002), 18, 99
Wolf et al. (2006), 67, 100
Xia et al. (2012), 24, 100
Xie et al. (1998), 20, 100
Xu et al. (2012), 42, 44, 100
Yamagata et al. (2008), 22, 100
Yan et al. (2001), 69, 100
Yang et al. (2008), 12, 16, 18, 20, 100
Yang et al. (2009), 65, 100
Yao et al. (1997), 22, 100
Yauch et al. (2009), 66, 100
Ye et al. (1997), 22, 23, 101
Ye et al. (1999), 24, 101
Yoshida et al. (2007), 24, 101
Yu et al. (2011), 65, 101
Yuan et al. (2004), 41, 68, 101
Zeltzer et al. (1999), 17, 42, 101
Zhang et al. (2011), 60, 67, 101
Zhao et al. (2006), 24, 101

-
- von Hoff et al. (2010), 36, 39, 97
Al-Halabi et al. (2011), 13, 15, 79
Alvarez-Medina et al. (2009), 50, 79
Aza-Blanc et al. (1997), 18, 80
González-Sancho et al. (2005), 69, 85
Krupczak-Hollis et al. (2004), 23, 89
Lüscher-Firzlaff et al. (1999), 22, 90
Matsumoto-Taniura et al. (1996), 22, 90
Vacheron-Trystram et al. (2004), 69, 97
Wechsler-Reya and Scott (1999), 18, 98
van den Boom et al. (2003), 24, 97

Literaturverzeichnis

- Aberle, H., Bauer, A., Stappert, J., Kispert, A., and Kemler, R. (1997). beta-catenin is a target for the ubiquitin-proteasome pathway. *EMBO Journal*, 16(13):3797–3804.
- Abla, A. A., Turner, J. D., and Sanai, N. (2012). FoxM1 is vital in the wnt/beta-catenin signaling pathogenesis of gliomas. *World Neurosurgery*, page Epub ahead of print.
- Adami, G. R. and Ye, H. (2007). Future roles for FoxM1 inhibitors in cancer treatments. *Future Oncology*, 3(1):1–3.
- Al-Halabi, H., Nantel, A., Klekner, A., Guiot, M., Albrecht, S., Hauser, P., Garami, M., Bognar, L., Kavan, P., Gerges, N., Shirinian, M., Roberge, D., Muanza, T., and Jabado, N. (2011). Preponderance of sonic hedgehog pathway activation characterizes adult medulloblastoma. *Acta Neuropathologica*, 121(2):229–239.
- Alcedo, J., Ayzenzon, M., Von Ohlen, T., Noll, M., and Hooper, J. E. (1996). The drosophila smoothened gene encodes a seven-pass membrane protein, a putative receptor for the hedgehog signal. *Cell*, 86(2):221–232.
- Alston, R. D., Newton, R., Kelsey, A., Newbould, M. J., Birch, J. M., Lawson, B., and McNally, R. J. Q. (2003). Childhood medulloblastoma in northwest England 1954 to 1997: incidence and survival. *Developmental Medicine and Child Neurology*, 45(5):308–314.
- Altman, J. and Bayer, S. A. (1996). *Development of the Cerebellar System: In Relation to its Evolution, Structure, and Functions*. CRC-Press, 1 edition.
- Alvarez-Medina, R., Le Dreau, G., Ros, M., and Martí, E. (2009). Hedgehog activation is required upstream of wnt signalling to control neural progenitor proliferation. *Development*, 136(19):3301–3309.
- Amit, S., Hatzubai, A., Birman, Y., Andersen, J. S., Ben-Shushan, E., Mann, M., Ben-Neriah, Y., and Alkalay, I. (2002). Axin-mediated CKI phosphorylation of beta-catenin at Ser 45: a molecular switch for the Wnt pathway. *Genes & Development*, 16(9):1066–1076.

- Angelucci, F., Aloe, L., Jiménez-Vasquez, P., and Mathé, A. A. (2003). Lithium treatment alters brain concentrations of nerve growth factor, brain-derived neurotrophic factor and glial cell line-derived neurotrophic factor in a rat model of depression. *International Journal of Neuropsychopharmacology*, 6(3):225–231.
- Angelucci, F., Mathé, A. A., and Aloe, L. (2004). Neurotrophic factors and CNS disorders: findings in rodent models of depression and schizophrenia. *Progress in Brain Research*, 146:151–165.
- Araki, K., Imaizumi, T., Okuyama, K., Oike, Y., and Yamamura, K. (1997). Efficiency of recombination by Cre transient expression in embryonic stem cells: comparison of various promoters. *Journal of Biochemistry*, 122(5):977–982.
- Aza-Blanc, P., Ramírez-Weber, F. A., Laget, M. P., Schwartz, C., and Kornberg, T. B. (1997). Proteolysis that is inhibited by hedgehog targets Cubitus interruptus protein to the nucleus and converts it to a repressor. *Cell*, 89(7):1043–1053.
- Bai, C. B., Auerbach, W., Lee, J. S., Stephen, D., and Joyner, A. L. (2002). Gli2, but not Gli1, is required for initial Shh signaling and ectopic activation of the Shh pathway. *Development*, 129(20):4753–4761.
- Bailey, P. and Cushing, H. (1925). Medulloblastoma cerebelli: A common type of midcerebellar glioma of childhood. *Archives of Neurology & Psychiatry*, 14(2):192–224.
- Bale, S. J., Falk, R. T., and Rogers, G. R. (1998). Patching together the genetics of Gorlin syndrome. *Journal of Cutaneous Medicine and Surgery*, 3(1):31–34.
- Balli, D., Zhang, Y., Snyder, J., Kalinichenko, V. V., and Kalin, T. V. (2011). Endothelial cell-specific deletion of transcription factor FoxM1 increases urethane-induced lung carcinogenesis. *Cancer Research*, 71(1):40–50.
- Bauer, M., Whybrow, P. C., Angst, J., Versiani, M., and Möller, H. (2002). World Federation of Societies of Biological Psychiatry (WFSBP) Guidelines for Biological Treatment of Unipolar Depressive Disorders, Part 2: Maintenance treatment of major depressive disorder and treatment of chronic depressive disorders and subthreshold depressions. *World Journal of Biological Psychiatry*, 3(2):69–86.
- Becher, O. J. and Holland, E. C. (2006). Genetically engineered models have advantages over xenografts for preclinical studies. *Cancer Research*, 66(7):3355–3359.
- Behrens, J., Jerchow, B. A., Würtele, M., Grimm, J., Asbrand, C., Wirtz, R., Kühl, M., Wedlich, D., and Birchmeier, W. (1998). Functional interaction of an axin homolog, conductin, with beta-catenin, APC, and GSK3beta. *Science*, 280(5363):596–599.
- Benayoun, B. A., Batista, F., Auer, J., Dipietromaria, A., L'Hôte, D., De Baere, E., and Veitia, R. A. (2009). Positive and negative feedback regulates the transcription factor

- FOXl2 in response to cell stress: evidence for a regulatory imbalance induced by disease-causing mutations. *Human Molecular Genetics*, 18(4):632–644.
- Benayoun, B. A., Caburet, S., and Veitia, R. A. (2011). Forkhead transcription factors: key players in health and disease. *Trends in Genetics*, 27(6):224–232.
- Bhanot, P., Brink, M., Samos, C. H., Hsieh, J. C., Wang, Y., Macke, J. P., Andrew, D., Nathans, J., and Nusse, R. (1996). A new member of the frizzled family from drosophila functions as a wingless receptor. *Nature*, 382(6588):225–230.
- Bhat, R. V., Budd Haeberlein, S. L., and Avila, J. (2004). Glycogen synthase kinase 3: a drug target for CNS therapies. *Journal of Neurochemistry*, 89(6):1313–1317.
- Brandeis, M. and Hunt, T. (1996). The proteolysis of mitotic cyclins in mammalian cells persists from the end of mitosis until the onset of S phase. *EMBO Journal*, 15(19):5280–5289.
- Brugières, L., Pierron, G., Chompret, A., Paillerets, B. B., Di Rocco, F., Varlet, P., Pierre-Kahn, A., Caron, O., Grill, J., and Delattre, O. (2010). Incomplete penetrance of the predisposition to medulloblastoma associated with germ-line SUFU mutations. *Journal of Medical Genetics*, 47(2):142–144.
- Caldwell, S. A., Jackson, S. R., Shahriari, K. S., Lynch, T. P., Sethi, G., Walker, S., Vosseller, K., and Reginato, M. J. (2010). Nutrient sensor O-GlcNAc transferase regulates breast cancer tumorigenesis through targeting of the oncogenic transcription factor FoxM1. *Oncogene*, 29(19):2831–2842.
- Calnan, D. R. and Brunet, A. (2008). The FoxO code. *Oncogene*, 27(16):2276–2288.
- Carlsson, P. and Mahlapuu, M. (2002). Forkhead transcription factors: key players in development and metabolism. *Developmental Biology*, 250(1):1–23.
- Castedo, M., Perfettini, J., Roumier, T., Andreau, K., Medema, R., and Kroemer, G. (2004). Cell death by mitotic catastrophe: a molecular definition. *Oncogene*, 23(16):2825–37.
- Chakraborty, G., Saito, M., Mao, R., Wang, R., Vadasz, C., and Saito, M. (2008). Lithium blocks ethanol-induced modulation of protein kinases in the developing brain. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 367(3):597–602.
- Chamorro, M. N., Schwartz, D. R., Vonica, A., Brivanlou, A. H., Cho, K. R., and Varmus, H. E. (2005). FGF-20 and DKK1 are transcriptional targets of beta-catenin and FGF-20 is implicated in cancer and development. *EMBO Journal*, 24(1):73–84.
- Chandran, U. R., Ma, C., Dhir, R., Bisceglia, M., Lyons-Weiler, M., Liang, W., Michalopoulos, G., Becich, M., and Monzon, F. A. (2007). Gene expression profiles of prostate cancer reveal involvement of multiple molecular pathways in the metastatic process. *BMC Cancer*, 7:64.

- Chen, G., Bower, K. A., Ma, C., Fang, S., Thiele, C. J., and Luo, J. (2004). Glycogen synthase kinase 3 β (GSK3 β) mediates 6-hydroxydopamine-induced neuronal death. *FASEB Journal*, 18(10):1162–1164.
- Chen, Y. and Struhl, G. (1996). Dual roles for patched in sequestering and transducing Hedgehog. *Cell*, 87(3):553–563.
- Chiang, C., Litingtung, Y., Lee, E., Young, K. E., Corden, J. L., Westphal, H., and Beachy, P. A. (1996). Cyclopia and defective axial patterning in mice lacking Sonic hedgehog gene function. *Nature*, 383(6599):407–413.
- Cho, Y., Tsherniak, A., Tamayo, P., Santagata, S., Ligon, A., Greulich, H., Berhoukim, R., Amani, V., Goumnerova, L., Eberhart, C. G., Lau, C. C., Olson, J. M., Gilbertson, R. J., Gajjar, A., Delattre, O., Kool, M., Ligon, K., Meyerson, M., Mesirov, J. P., and Pomeroy, S. L. (2010). Integrative genomic analysis of medulloblastoma identifies a molecular subgroup that drives poor clinical outcome. *Journal of Clinical Oncology*, 29(11):1424–30.
- Chomczynski, P. (1993). A reagent for the single-step simultaneous isolation of RNA, DNA and proteins from cell and tissue samples. *Biotechniques*, 15(3):532–534, 536–537.
- Chong, J. M., Uren, A., Rubin, J. S., and Speicher, D. W. (2002). Disulfide bond assignments of secreted frizzled-related protein-1 provide insights about frizzled homology and netrin modules. *Journal of Biological Chemistry*, 277(7):5134–5144.
- Clark, K. L., Halay, E. D., Lai, E., and Burley, S. K. (1993). Co-crystal structure of the HNF-3/fork head DNA-recognition motif resembles histone H5. *Nature*, 364(6436):412–420.
- Clifford, S. C., Lusher, M. E., Lindsey, J. C., Langdon, J. A., Gilbertson, R. J., Straughton, D., and Ellison, D. W. (2006). Wnt/Wingless pathway activation and chromosome 6 loss characterize a distinct molecular sub-group of medulloblastomas associated with a favorable prognosis. *Cell Cycle*, 5(22):2666–2670.
- Corbit, K. C., Aanstad, P., Singla, V., Norman, A. R., Stainier, D. Y. R., and Reiter, J. F. (2005). Vertebrate Smoothed functions at the primary cilium. *Nature*, 437(7061):1018–1021.
- Corcoran, R. B. and Scott, M. P. (2001). A mouse model for medulloblastoma and basal cell nevus syndrome. *Journal of Neurooncology*, 53(3):307–318.
- Costa, R. H. (2005). FoxM1 dances with mitosis. *Nature Cell Biology*, 7(2):108–110.
- Crawford, J. R., MacDonald, T. J., and Packer, R. J. (2007). Medulloblastoma in childhood: new biological advances. *Lancet Neurology*, 6(12):1073–1085.

- Dai, B., Kang, S., Gong, W., Liu, M., Aldape, K. D., Sawaya, R., and Huang, S. (2007). Aberrant FoxM1B expression increases matrix metalloproteinase-2 transcription and enhances the invasion of glioma cells. *Oncogene*, 26(42):6212–6219.
- Dai, B., Pieper, R. O., Li, D., Wei, P., Liu, M., Woo, S. Y., Aldape, K. D., Sawaya, R., Xie, K., and Huang, S. (2010). FoxM1B regulates NEDD4-1 expression, leading to cellular transformation and full malignant phenotype in immortalized human astrocytes. *Cancer Research*, 70(7):2951–2961.
- Damm, C. E., Hsieh, J. C., Rattner, A., Sharma, D., Nathans, J., and Leahy, D. J. (2001). Insights into Wnt binding and signalling from the structures of two Frizzled cysteine-rich domains. *Nature*, 412(6842):86–90.
- Deckert, M., Reifenberger, G., and Wechsler, W. (1989). Determination of the proliferative potential of human brain tumors using the monoclonal antibody ki-67. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, 115(2):179–188.
- Duffner, P. K., Horowitz, M. E., Krischer, J. P., Friedman, H. S., Burger, P. C., Cohen, M. E., Sanford, R. A., Mulhern, R. K., James, H. E., and Freeman, C. R. (1993). Post-operative chemotherapy and delayed radiation in children less than three years of age with malignant brain tumors. *New England Journal of Medicine*, 328(24):1725–1731.
- Dunner, D. L. (2003). Drug interactions of lithium and other antimanic/mood-stabilizing medications. *Journal of Clinical Psychiatry*, 64:38–43.
- Eberhart, C. G. (2007). In search of the medulloblast: neural stem cells and embryonal brain tumors. *Neurosurgery Clinics of North America*, 18(1):59–69.
- Echelard, Y., Epstein, D. J., St-Jacques, B., Shen, L., Mohler, J., McMahon, J. A., and McMahon, A. P. (1993). Sonic hedgehog, a member of a family of putative signaling molecules, is implicated in the regulation of CNS polarity. *Cell*, 75(7):1417–1430.
- Eldar-Finkelman, H. (2002). Glycogen synthase kinase 3: an emerging therapeutic target. *Trends in Molecular Medicine*, 8(3):126–132.
- Ellison, D. W. (2010). Childhood medulloblastoma: novel approaches to the classification of a heterogeneous disease. *Acta Neuropathologica*, 120(3):305–316.
- Ellison, D. W., Dalton, J., Kocak, M., Nicholson, S. L., Fraga, C., Neale, G., Kenney, A. M., Brat, D. J., Perry, A., Yong, W. H., Taylor, R. E., Bailey, S., Clifford, S. C., and Gilbertson, R. J. (2011). Medulloblastoma: clinicopathological correlates of SHH, WNT, and non-SHH/WNT molecular subgroups. *Acta Neuropathologica*, 121(3):381–396.
- Evan, G. I. and Vousden, K. H. (2001). Proliferation, cell cycle and apoptosis in cancer. *Nature*, 411(6835):342–348.

- Evans, A. E., Jenkin, R. D., Sposto, R., Ortega, J. A., Wilson, C. B., Wara, W., Ertel, I. J., Kramer, S., Chang, C. H., and Leikin, S. L. (1990). The treatment of medulloblastoma. results of a prospective randomized trial of radiation therapy with and without CCNU, vincristine, and prednisone. *Journal of Neurosurgery*, 72(4):572–582.
- Fairbanks, G., Steck, T. L., and Wallach, D. F. (1971). Electrophoretic analysis of the major polypeptides of the human erythrocyte membrane. *Biochemistry*, 10(13):2606–2617.
- Farwell, J. and Flannery, J. T. (1984). Second primaries in children with central nervous system tumors. *Journal of Neurooncology*, 2(4):371–375.
- Fattet, S., Haberler, C., Legoux, P., Varlet, P., Lellouch-Tubiana, A., Lair, S., Manie, E., Raquin, M., Bours, D., Carpentier, S., Barillot, E., Grill, J., Doz, F., Puget, S., Janoueix-Lerosey, I., and Delattre, O. (2009). Beta-catenin status in paediatric medulloblastomas: correlation of immunohistochemical expression with mutational status, genetic profiles, and clinical characteristics. *Journal of Pathology*, 218(1):86–94.
- Fomchenko, E. I. and Holland, E. C. (2006). Mouse models of brain tumors and their applications in preclinical trials. *Clinical Cancer Research*, 12(18):5288–5297.
- Fornai, F., Longone, P., Cafaro, L., Kastsiuchenka, O., Ferrucci, M., Manca, M. L., Lazzeri, G., Spalloni, A., Bellio, N., Lenzi, P., Modugno, N., Siciliano, G., Isidoro, C., Murri, L., Ruggieri, S., and Paparelli, A. (2008). Lithium delays progression of amyotrophic lateral sclerosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(6):2052–2057.
- Francis, R. E., Myatt, S. S., Krol, J., Hartman, J., Peck, B., McGovern, U. B., Wang, J., Guest, S. K., Filipovic, A., Gojis, O., Palmieri, C., Peston, D., Shousha, S., Yu, Q., Sicinski, P., Coombes, R. C., and Lam, E. W. (2009). FoxM1 is a downstream target and marker of HER2 overexpression in breast cancer. *International Journal of Oncology*, 35(1):57–68.
- Garcia y Narvaiza, D., Navarrete, M. A. H., Falzoni, R., Maier, C. M., and Nazário, A. C. P. (2008). Effect of combined oral contraceptives on breast epithelial proliferation in young women. *Breast Journal*, 14(5):450–455.
- Gatta, G., Zigon, G., Capocaccia, R., Coebergh, J. W., Desandes, E., Kaatsch, P., Pastore, G., Peris-Bonet, R., and Stiller, C. A. (2009). Survival of european children and young adults with cancer diagnosed 1995-2002. *European Journal of Cancer*, 45(6):992–1005.
- Gerdes, J. (1990). Ki-67 and other proliferation markers useful for immunohistological diagnostic and prognostic evaluations in human malignancies. *Seminars in Cancer Biology*, 1(3):199–206.
- Gibson, D. A. and Ma, L. (2011). Mosaic analysis of gene function in postnatal mouse brain development by using virus-based cre recombination. *Journal of Visualized Experiments*, (54).

- Gibson, P., Tong, Y., Robinson, G., Thompson, M. C., Currle, D. S., Eden, C., Kranenburg, T. A., Hogg, T., Poppleton, H., Martin, J., Finkelstein, D., Pounds, S., Weiss, A., Patay, Z., Scoggins, M., Ogg, R., Pei, Y., Yang, Z., Brun, S., Lee, Y., Zindy, F., Lindsey, J. C., Taketo, M. M., Boop, F. A., Sanford, R. A., Gajjar, A., Clifford, S. C., Roussel, M. F., McKinnon, P. J., Gutmann, D. H., Ellison, D. W., Wechsler-Reya, R., and Gilbertson, R. J. (2010). Subtypes of medulloblastoma have distinct developmental origins. *Nature*, 468(7327):1095–1099.
- Gilbertson, R. J. (2004). Medulloblastoma: signalling a change in treatment. *Lancet Oncology*, 5(4):209–218.
- Gilbertson, R. J. and Ellison, D. W. (2008). The origins of medulloblastoma subtypes. *Annual Review of Pathology*, 3:341–365.
- Goldbaum, O. and Richter-Landsberg, C. (2002). Activation of PP2A-like phosphatase and modulation of tau phosphorylation accompany stress-induced apoptosis in cultured oligodendrocytes. *Glia*, 40(3):271–282.
- González-Sancho, J. M., Aguilera, O., García, J. M., Pendás-Franco, N., Pena, C., Cal, S., García de Herreros, A., Bonilla, F., and Munoz, A. (2005). The wnt antagonist DICKKOPF-1 gene is a downstream target of beta-catenin/TCF and is downregulated in human colon cancer. *Oncogene*, 24(6):1098–1103.
- Goodrich, L. V., Milenkovic, L., Higgins, K. M., and Scott, M. P. (1997). Altered neural cell fates and medulloblastoma in mouse patched mutants. *Science*, 277(5329):1109–1113.
- Gould, T. D., Zarate, C. A., and Manji, H. K. (2004). Glycogen synthase kinase-3: a target for novel bipolar disorder treatments. *Journal of Clinical Psychiatry*, 65(1):10–21.
- Grammel, D., Warmuth-Metz, M., von Bueren, A. O., Kool, M., Pietsch, T., Kretzschmar, H. A., Rowitch, D. H., Rutkowski, S., Pfister, S. M., and Schüller, U. (2012). Sonic hedgehog-associated medulloblastoma arising from the cochlear nuclei of the brainstem. *Acta Neuropathologica*, 123(4):601–14.
- Grasselli, G., Mandolesi, G., Strata, P., and Cesare, P. (2011). Impaired sprouting and axonal atrophy in cerebellar climbing fibres following in vivo silencing of the Growth-Associated protein GAP-43. *PLoS One*, 6(6):e20791.
- Greer, E. L., Oskoui, P. R., Banko, M. R., Maniar, J. M., Gygi, M. P., Gygi, S. P., and Brunet, A. (2007). The energy sensor AMP-activated protein kinase directly regulates the mammalian FOXO3 transcription factor. *Journal of Biological Chemistry*, 282(41):30107–30119.
- Guan, P., Chen, H., Li, H., Duan, J., and Chen, J. (2011). Expression and significance of FOXM1 in human cervical cancer: a tissue micro-array study. *Clinical and Investigative Medicine*, 34(1):E1–7.

- Gusarova, G. A., Wang, I., Major, M. L., Kalinichenko, V. V., Ackerson, T., Petrovic, V., and Costa, R. H. (2007). A cell-penetrating ARF peptide inhibitor of FoxM1 in mouse hepatocellular carcinoma treatment. *Journal of Clinical Investigation*, 117(1):99–111.
- Hahn, H., Wicking, C., Zaphiropoulous, P. G., Gailani, M. R., Shanley, S., Chidambaram, A., Vorechovsky, I., Holmberg, E., Unden, A. B., Gillies, S., Negus, K., Smyth, I., Pressman, C., Leffell, D. J., Gerrard, B., Goldstein, A. M., Dean, M., Toftgard, R., Chenevix-Trench, G., Wainwright, B., and Bale, A. E. (1996). Mutations of the human homolog of *Drosophila* patched in the nevoid basal cell carcinoma syndrome. *Cell*, 85(6):841–851.
- Halasi, M., Zhao, H., Dahari, H., Bhat, U. G., Gonzalez, E. B., Lyubimov, A. V., Tonetti, D. A., and Gartel, A. L. (2010). Thiazole antibiotics against breast cancer. *Cell Cycle*, 9(6):1214–7.
- Hallahan, A. R., Pritchard, J. I., Hansen, S., Benson, M., Stoeck, J., Hatton, B. A., Russell, T. L., Ellenbogen, R. G., Bernstein, I. D., Beachy, P. A., and Olson, J. M. (2004). The SmoA1 mouse model reveals that notch signaling is critical for the growth and survival of sonic hedgehog-induced medulloblastomas. *Cancer Research*, 64(21):7794 –7800.
- Hamada, F., Tomoyasu, Y., Takatsu, Y., Nakamura, M., Nagai, S., Suzuki, A., Fujita, F., Shibuya, H., Toyoshima, K., Ueno, N., and Akiyama, T. (1999). Negative regulation of wingless signaling by D-axin, a *Drosophila* homolog of axin. *Science*, 283(5408):1739–1742.
- Hamilton, S. R., Liu, B., Parsons, R. E., Papadopoulos, N., Jen, J., Powell, S. M., Krush, A. J., Berk, T., Cohen, Z., and Tetu, B. (1995). The molecular basis of Turcot’s syndrome. *New England Journal of Medicine*, 332(13):839–847.
- Hannenhalli, S. and Kaestner, K. H. (2009). The evolution of Fox genes and their role in development and disease. *Nature Reviews Genetics*, 10(4):233–240.
- Hannon, G. J. and Rossi, J. J. (2004). Unlocking the potential of the human genome with RNA interference. *Nature*, 431(7006):371–378.
- Harada, N., Tamai, Y., Ishikawa, T., Sauer, B., Takaku, K., Oshima, M., and Taketo, M. M. (1999). Intestinal polyposis in mice with a dominant stable mutation of the beta-catenin gene. *EMBO Journal*, 18(21):5931–5942.
- Hatten, M. E. and Roussel, M. F. (2011). Development and cancer of the cerebellum. *Trends in Neurosciences*, 34(3):134–142.
- He, T. C., Sparks, A. B., Rago, C., Hermeking, H., Zawel, L., da Costa, L. T., Morin, P. J., Vogelstein, B., and Kinzler, K. W. (1998). Identification of c-MYC as a target of the APC pathway. *Science*, 281(5382):1509–1512.

- Ho, S., Wang, K., Whisenhunt, T. R., Huang, P., Zhu, X., Kudlow, J. E., and Paterson, A. J. (2010). O-GlcNAcylation enhances FOXO4 transcriptional regulation in response to stress. *FEBS Letters*, 584(1):49–54.
- Huangfu, D. and Anderson, K. V. (2006). Signaling from Smo to Ci/Gli: conservation and divergence of Hedgehog pathways from *Drosophila* to vertebrates. *Development*, 133(1):3–14.
- Hughes, E. N., Shillito, J., Sallan, S. E., Loeffler, J. S., Cassady, J. R., and Tarbell, N. J. (1988). Medulloblastoma at the joint center for radiation therapy between 1968 and 1984. the influence of radiation dose on the patterns of failure and survival. *Cancer*, 61(10):1992–1998.
- Itoh, K., Krupnik, V. E., and Sokol, S. Y. (1998). Axis determination in xenopus involves biochemical interactions of axin, glycogen synthase kinase 3 and beta-catenin. *Current Biology*, 8(10):591–594.
- Jacobson, M. D., Weil, M., and Raff, M. C. (1997). Programmed cell death in animal development. *Cell*, 88(3):347–354.
- Jenkins, D. (2009). Hedgehog signalling: emerging evidence for non-canonical pathways. *Cellular Signalling*, 21(7):1023–1034.
- Jeong, J., Mao, J., Tenzen, T., Kottmann, A. H., and McMahon, A. P. (2004). Hedgehog signaling in the neural crest cells regulates the patterning and growth of facial primordia. *Genes & Development*, 18(8):937–951.
- Jho, E., Zhang, T., Domon, C., Joo, C., Freund, J., and Costantini, F. (2002). Wnt/beta-catenin/Tcf signaling induces the transcription of axin2, a negative regulator of the signaling pathway. *Molecular and Cellular Biology*, 22(4):1172–1183.
- Jones, S. E. and Jomary, C. (2002). Secreted frizzled-related proteins: searching for relationships and patterns. *Bioessays*, 24(9):811–820.
- Joep, R. S. (2003). Lithium and GSK-3: one inhibitor, two inhibitory actions, multiple outcomes. *Trends in Pharmacological Sciences*, 24(9):441–443.
- Kaestner, K. H., Knochel, W., and Martinez, D. E. (2000). Unified nomenclature for the winged helix/forkhead transcription factors. *Genes & Development*, 14(2):142–6.
- Kalbfleisch, J. D. and Prentice, R. L. (1980). *The Statistical Analysis of Failure Time Data*. John Wiley & Sons, 2 edition.
- Kalin, T. V., Wang, I., Ackerson, T. J., Major, M. L., Detrisac, C. J., Kalinichenko, V. V., Lyubimov, A., and Costa, R. H. (2006). Increased levels of the FoxM1 transcription factor accelerate development and progression of prostate carcinomas in both TRAMP and LADY transgenic mice. *Cancer Research*, 66(3):1712–1720.

- Kalin, T. V., Wang, I., Meliton, L., Zhang, Y., Wert, S. E., Ren, X., Snyder, J., Bell, S. M., Graf, Lloyd, J., Whitsett, J. A., and Kalinichenko, V. V. (2008). Forkhead box m1 transcription factor is required for perinatal lung function. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(49):19330–19335.
- Kalinichenko, V. V., Major, M. L., Wang, X., Petrovic, V., Kuechle, J., Yoder, H. M., Dennewitz, M. B., Shin, B., Datta, A., Raychaudhuri, P., and Costa, R. H. (2004). Foxm1b transcription factor is essential for development of hepatocellular carcinomas and is negatively regulated by the p19ARF tumor suppressor. *Genes & Development*, 18(7):830–850.
- Kaplan, E. L. and Meier, P. (1958). Nonparametric estimation from incomplete observations. *Journal of the American Statistical Association*, 53(282):457–481.
- Kim, I., Ackerson, T., Ramakrishna, S., Tretiakova, M., Wang, I., Kalin, T. V., Major, M. L., Gusarova, G. A., Yoder, H. M., Costa, R. H., and Kalinichenko, V. V. (2006). The forkhead box m1 transcription factor stimulates the proliferation of tumor cells during development of lung cancer. *Cancer Research*, 66(4):2153–2161.
- Kim, I., Ramakrishna, S., Gusarova, G. A., Yoder, H. M., Costa, R. H., and Kalinichenko, V. V. (2005). The forkhead box m1 transcription factor is essential for embryonic development of pulmonary vasculature. *Journal of Biological Chemistry*, 280(23):22278–22286.
- Kim, J., Shin, H. S., Lee, S. H., Lee, I., Lee, Y. S., Park, J. C., Kim, Y. J., Chung, J. B., and Lee, Y. C. (2010). Contrasting activity of hedgehog and wnt pathways according to gastric cancer cell differentiation: relevance of crosstalk mechanisms. *Cancer Science*, 101(2):328–335.
- Koo, C., Muir, K. W., and Lam, E. W. (2012). FOXM1: from cancer initiation to progression and treatment. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1819(1):28–37.
- Kool, M., Koster, J., Bunt, J., Hasselt, N. E., Lakeman, A., van Sluis, P., Troost, D., Meeteren, N. S., Caron, H. N., Cloos, J., Mrcic, A., Ylstra, B., Grajkowska, W., Hartmann, W., Pietsch, T., Ellison, D., Clifford, S. C., and Versteeg, R. (2008). Integrated genomics identifies five medulloblastoma subtypes with distinct genetic profiles, pathway signatures and clinicopathological features. *PLoS One*, 3(8):e3088.
- Kortmann, R. D., Kühl, J., Timmermann, B., Mittler, U., Urban, C., Budach, V., Richter, E., Willich, N., Flentje, M., Berthold, F., Slavic, I., Wolff, J., Meisner, C., Wiestler, O., Sörensen, N., Warmuth-Metz, M., and Bamberg, M. (2000). Postoperative neoadjuvant chemotherapy before radiotherapy as compared to immediate radiotherapy followed by maintenance chemotherapy in the treatment of medulloblastoma in childhood: results of the german prospective randomized trial HIT '91. *International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics*, 46(2):269–279.

- Korver, W., Roose, J., and Clevers, H. (1997a). The winged-helix transcription factor trident is expressed in cycling cells. *Nucleic Acids Research*, 25(9):1715–1719.
- Korver, W., Roose, J., Heinen, K., Weghuis, D. O., de Bruijn, D., van Kessel, A. G., and Clevers, H. (1997b). The human TRIDENT/HFH-11/FKHL16 gene: structure, localization, and promoter characterization. *Genomics*, 46(3):435–442.
- Krupczak-Hollis, K., Wang, X., Kalinichenko, V. V., Gusarova, G. A., Wang, I., Dennewitz, M. B., Yoder, H. M., Kiyokawa, H., Kaestner, K. H., and Costa, R. H. (2004). The mouse forkhead box m1 transcription factor is essential for hepatoblast mitosis and development of intrahepatic bile ducts and vessels during liver morphogenesis. *Developmental Biology*, 276(1):74–88.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage t4. *Nature*, 227(5259):680–685.
- Laoukili, J., Kooistra, M. R. H., Brás, A., Kauw, J., Kerkhoven, R. M., Morrison, A., Clevers, H., and Medema, R. H. (2005). FoxM1 is required for execution of the mitotic programme and chromosome stability. *Nature Cell Biology*, 7(2):126–136.
- Laoukili, J., Stahl, M., and Medema, R. H. (2007). FoxM1: at the crossroads of ageing and cancer. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1775(1):92–102.
- Li, B., Samanta, A., Song, X., Iacono, K. T., Bembas, K., Tao, R., Basu, S., Riley, J. L., Hancock, W. W., Shen, Y., Saouaf, S. J., and Greene, M. I. (2007). FOXP3 interactions with histone acetyltransferase and class II histone deacetylases are required for repression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(11):4571–4576.
- Li, L., Connelly, M. C., Wetmore, C., Curran, T., and Morgan, J. I. (2003). Mouse embryos cloned from brain tumors. *Cancer Research*, 63(11):2733–2736.
- Lin, B., Madan, A., Yoon, J., Fang, X., Yan, X., Kim, T., Hwang, D., Hood, L., and Foltz, G. (2010). Massively parallel signature sequencing and bioinformatics analysis identifies up-regulation of TGFBI and SOX4 in human glioblastoma. *PLoS One*, 5(4):e10210.
- Liu, M., Dai, B., Kang, S., Ban, K., Huang, F., Lang, F. F., Aldape, K. D., Xie, T.-x., Pelloski, C. E., Xie, K., Sawaya, R., and Huang, S. (2006). FoxM1B is overexpressed in human glioblastomas and critically regulates the tumorigenicity of glioma cells. *Cancer Research*, 66(7):3593–3602.
- Lorenz, A., Deutschmann, M., Ahlfeld, J., Prix, C., Koch, A., Smits, R., Fodde, R., Kretschmar, H. A., and Schüller, U. (2011). Severe alterations of cerebellar cortical development after constitutive activation of wnt signaling in granule neuron precursors. *Molecular and Cellular Biology*, 31(16):3326–3338.

- Louis, D. N., Ohgaki, H., Wiestler, O. D., Cavenee, W. K., Burger, P. C., Jouvett, A., Scheithauer, B. W., and Kleihues, P. (2007). The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. *Acta Neuropathologica*, 114(2):97–109.
- Lüscher-Firzlaff, J. M., Westendorf, J. M., Zwicker, J., Burkhardt, H., Henriksson, M., Müller, R., Pirollet, F., and Lüscher, B. (1999). Interaction of the fork head domain transcription factor MPP2 with the human papilloma virus 16 e7 protein: enhancement of transformation and transactivation. *Oncogene*, 18(41):5620–30.
- Lum, L. and Beachy, P. A. (2004). The hedgehog response network: sensors, switches, and routers. *Science*, 304(5678):1755–1759.
- Lustig, B., Jerchow, B., Sachs, M., Weiler, S., Pietsch, T., Karsten, U., van de Wetering, M., Clevers, H., Schlag, P. M., Birchmeier, W., and Behrens, J. (2002). Negative feedback loop of wnt signaling through upregulation of conductin/axin2 in colorectal and liver tumors. *Molecular and Cellular Biology*, 22(4):1184–1193.
- Ma, R. Y. M., Tong, T. H. K., Cheung, A. M. S., Tsang, A. C. C., Leung, W. Y., and Yao, K. (2005). Raf/MEK/MAPK signaling stimulates the nuclear translocation and transactivating activity of FOXM1c. *Journal of Cell Science*, 118(4):795–806.
- Mao, J., Ligon, K. L., Rakhlin, E. Y., Thayer, S. P., Bronson, R. T., Rowitch, D., and McMahon, A. P. (2006). A novel somatic mouse model to survey tumorigenic potential applied to the hedgehog pathway. *Cancer Research*, 66(20):10171–10178.
- Matsumoto-Taniura, N., Pirollet, F., Monroe, R., Gerace, L., and Westendorf, J. M. (1996). Identification of novel m phase phosphoproteins by expression cloning. *Molecular Biology of the Cell*, 7(9):1455–1469.
- Metcalf, C. and de Sauvage, F. J. (2011). Hedgehog fights back: mechanisms of acquired resistance against smoothened antagonists. *Cancer Research*, 71(15):5057–5061.
- Millour, J., Constantinidou, D., Stavropoulou, A. V., Wilson, M. S. C., Myatt, S. S., Kwok, J. M., Sivanandan, K., Coombes, R. C., Medema, R. H., Hartman, J., Lykkesfeldt, A. E., and Lam, E. W. (2010). FOXM1 is a transcriptional target of ERalpha and has a critical role in breast cancer endocrine sensitivity and resistance. *Oncogene*, 20(29):2983–95.
- Moschovi, M., Alexiou, G. A., Patereli, A., Stefanaki, K., Doussis-Anagnostopoulou, I., Stofas, A., Sfakianos, G., and Prodromou, N. (2011). Prognostic significance of cyclin a and b1 in pediatric embryonal tumors. *Journal of Neurooncology*, 103(3):699–704.
- Nakamura, T., Furukawa, Y., Nakagawa, H., Tsunoda, T., Ohigashi, H., Murata, K., Ishikawa, O., Ohgaki, K., Kashimura, N., Miyamoto, M., Hirano, S., Kondo, S., Katoh, H., Nakamura, Y., and Katagiri, T. (2004). Genome-wide cDNA microarray analysis of gene expression profiles in pancreatic cancers using populations of tumor cells and normal ductal epithelial cells selected for purity by laser microdissection. *Oncogene*, 23(13):2385–2400.

- Network, T. C. G. A. R. (2011). Integrated genomic analyses of ovarian carcinoma. *Nature*, 474(7353):609–615.
- Niida, A., Hiroko, T., Kasai, M., Furukawa, Y., Nakamura, Y., Suzuki, Y., Sugano, S., and Akiyama, T. (2004). DKK1, a negative regulator of wnt signaling, is a target of the beta-catenin/TCF pathway. *Oncogene*, 23(52):8520–8526.
- Northcott, P. A., Hielscher, T., Dubuc, A., Mack, S., Shih, D., Remke, M., Al-Halabi, H., Albrecht, S., Jabado, N., Eberhart, C. G., Grajkowska, W., Weiss, W. A., Clifford, S. C., Bouffet, E., Rutka, J. T., Korshunov, A., Pfister, S., and Taylor, M. D. (2011a). Pediatric and adult sonic hedgehog medulloblastomas are clinically and molecularly distinct. *Acta Neuropathologica*, 122(2):231–240.
- Northcott, P. A., Korshunov, A., Pfister, S. M., and Taylor, M. D. (2012). The clinical implications of medulloblastoma subgroups. *Nature Reviews Neurology*, 8(6):340–351.
- Northcott, P. A., Korshunov, A., Witt, H., Hielscher, T., Eberhart, C. G., Mack, S., Bouffet, E., Clifford, S. C., Hawkins, C. E., French, P., Rutka, J. T., Pfister, S., and Taylor, M. D. (2011b). Medulloblastoma comprises four distinct molecular variants. *Journal of Clinical Oncology*, 29(11):1408–1414.
- Northcott, P. A., Nakahara, Y., Wu, X., Feuk, L., Ellison, D. W., Croul, S., Mack, S., Kongkham, P. N., Peacock, J., Dubuc, A., Ra, Y., Zilberberg, K., McLeod, J., Scherer, S. W., Sunil Rao, J., Eberhart, C. G., Grajkowska, W., Gillespie, Y., Lach, B., Grundy, R., Pollack, I. F., Hamilton, R. L., Van Meter, T., Carlotti, C. G., Boop, F., Bigner, D., Gilbertson, R. J., Rutka, J. T., and Taylor, M. D. (2009). Multiple recurrent genetic events converge on control of histone lysine methylation in medulloblastoma. *Nature Genetics*, 41(4):465–472.
- Obama, K., Ura, K., Li, M., Katagiri, T., Tsunoda, T., Nomura, A., Satoh, S., Nakamura, Y., and Furukawa, Y. (2005). Genome-wide analysis of gene expression in human intrahepatic cholangiocarcinoma. *Hepatology*, 41(6):1339–1348.
- Oliver, T. G., Read, T. A., Kessler, J. D., Mehmeti, A., Wells, J. F., Huynh, T. T. T., Lin, S. M., and Wechsler-Reya, R. J. (2005). Loss of patched and disruption of granule cell development in a pre-neoplastic stage of medulloblastoma. *Development*, 132(10):2425–2439.
- Packer, R. J., Goldwein, J., Nicholson, H. S., Vezina, L. G., Allen, J. C., Ris, M. D., Muraszko, K., Rorke, L. B., Wara, W. M., Cohen, B. H., and Boyett, J. M. (1999). Treatment of children with medulloblastomas with reduced-dose craniospinal radiation therapy and adjuvant chemotherapy: A children’s cancer group study. *Journal of Clinical Oncology*, 17(7):2127–2136.
- Pan, N., Jahan, I., Kersigo, J., Kopecky, B., Santi, P., Johnson, S., Schmitz, H., and Fritzsche, B. (2011). Conditional deletion of Atoh1 using Pax2-Cre results in viable mice

- without differentiated cochlear hair cells that have lost most of the organ of corti. *Hearing research*, 275(1-2):66–80.
- Pastorino, L., Ghiorzo, P., Nasti, S., Battistuzzi, L., Cusano, R., Marzocchi, C., Garrè, M. L., Clementi, M., and Scarrà, G. B. (2009). Identification of a SUFU germline mutation in a family with gorlin syndrome. *American Journal of Medical Genetics*, 149A(7):1539–1543.
- Persson, M., Stamatakis, D., te Welscher, P., Andersson, E., Böse, J., Rütger, U., Ericson, J., and Briscoe, J. (2002). Dorsal-ventral patterning of the spinal cord requires gli3 transcriptional repressor activity. *Genes & Development*, 16(22):2865–2878.
- Pietsch, T., Waha, A., Koch, A., Kraus, J., Albrecht, S., Tonn, J., Sörensen, N., Berthold, F., Henk, B., Schmandt, N., Wolf, H. K., von Deimling, A., Wainwright, B., Chenevix-Trench, G., Wiestler, O. D., and Wicking, C. (1997). Medulloblastomas of the desmoplastic variant carry mutations of the human homologue of drosophila patched. *Cancer Research*, 57(11):2085–2088.
- Pilarsky, C., Wenzig, M., Specht, T., Saeger, H. D., and Grützmann, R. (2004). Identification and validation of commonly overexpressed genes in solid tumors by comparison of microarray data. *Neoplasia*, 6(6):744–750.
- Pilpel, N., Landeck, N., Klugmann, M., Seeburg, P. H., and Schwarz, M. K. (2009). Rapid, reproducible transduction of select forebrain regions by targeted recombinant virus injection into the neonatal mouse brain. *Journal of Neuroscience Methods*, 182(1):55–63.
- Planel, E., Yasutake, K., Fujita, S. C., and Ishiguro, K. (2001). Inhibition of protein phosphatase 2A overrides tau protein kinase i/glycogen synthase kinase 3 beta and cyclin-dependent kinase 5 inhibition and results in tau hyperphosphorylation in the hippocampus of starved mouse. *Journal of Biological Chemistry*, 276(36):34298–34306.
- Polkinghorn, W. R. and Tarbell, N. J. (2007). Medulloblastoma: tumorigenesis, current clinical paradigm, and efforts to improve risk stratification. *Nature Clinical Practice. Oncology*, 4(5):295–304.
- Pomeroy, S. L., Tamayo, P., Gaasenbeek, M., Sturla, L. M., Angelo, M., McLaughlin, M. E., Kim, J. Y. H., Goumnerova, L. C., Black, P. M., Lau, C., Allen, J. C., Zagzag, D., Olson, J. M., Curran, T., Wetmore, C., Biegel, J. A., Poggio, T., Mukherjee, S., Rifkin, R., Califano, A., Stolovitzky, G., Louis, D. N., Mesirov, J. P., Lander, E. S., and Golub, T. R. (2002). Prediction of central nervous system embryonal tumour outcome based on gene expression. *Nature*, 415(6870):436–442.
- Portugal, J., Mansilla, S., and Bataller, M. (2010). Mechanisms of drug-induced mitotic catastrophe in cancer cells. *Current Pharmaceutical Design*, 16(1):69–78.

- Pérez, M., Rojo, A. I., Wandosell, F., Díaz-Nido, J., and Avila, J. (2003). Prion peptide induces neuronal cell death through a pathway involving glycogen synthase kinase 3. *Biochemical Journal*, 372(Pt 1):129–136.
- Radhakrishnan, S. K., Bhat, U. G., Hughes, D. E., Wang, I., Costa, R. H., and Gartel, A. L. (2006). Identification of a chemical inhibitor of the oncogenic transcription factor forkhead box m1. *Cancer Research*, 66(19):9731–9735.
- Ramachandran, C., Khatib, Z., Escalon, E., Fonseca, H. B., Jhabvala, P., Medina, L. S., D’Souza, B., Ragheb, J., Morrison, G., and Melnick, S. J. (2002). Molecular studies in pediatric medulloblastomas. *Brain Tumor Pathology*, 19(1):15–22.
- Rametti, A., Esclaire, F., Yardin, C., and Terro, F. (2004). Linking alterations in tau phosphorylation and cleavage during neuronal apoptosis. *Journal of Biological Chemistry*, 279(52):54518–54528.
- Remke, M., Hielscher, T., Korshunov, A., Northcott, P. A., Bender, S., Kool, M., Westermann, F., Benner, A., Cin, H., Ryzhova, M., Sturm, D., Witt, H., Haag, D., Toedt, G., Wittmann, A., Schöttler, A., von Bueren, A. O., von Deimling, A., Rutkowski, S., Scheurlen, W., Kulozik, A. E., Taylor, M. D., Lichter, P., and Pfister, S. M. (2011a). FSTL5 is a marker of poor prognosis in non-WNT/non-SHH medulloblastoma. *Journal of Clinical Oncology*, 29(29):3852–3861.
- Remke, M., Hielscher, T., Northcott, P. A., Witt, H., Ryzhova, M., Wittmann, A., Benner, A., von Deimling, A., Scheurlen, W., Perry, A., Croul, S., Kulozik, A. E., Lichter, P., Taylor, M. D., Pfister, S. M., and Korshunov, A. (2011b). Adult medulloblastoma comprises three major molecular variants. *Journal of Clinical Oncology*, 29(19):2717–2723.
- Ren, X., Zhang, Y., Snyder, J., Cross, E. R., Shah, T. A., Kalin, T. V., and Kalinichenko, V. V. (2010). Forkhead box m1 transcription factor is required for macrophage recruitment during liver repair. *Molecular and Cellular Biology*, 30(22):5381–5393.
- Ribi, K., Relly, C., Landolt, M. A., Alber, F. D., Boltshauser, E., and Grotzer, M. A. (2005). Outcome of medulloblastoma in children: long-term complications and quality of life. *Neuropediatrics*, 36(6):357–365.
- Rogers, H. A., Miller, S., Lowe, J., Brundler, M., Coyle, B., and Grundy, R. G. (2009). An investigation of WNT pathway activation and association with survival in central nervous system primitive neuroectodermal tumours (CNS PNET). *British Journal of Cancer*, 100(8):1292–1302.
- Rudin, C. M., Hann, C. L., Laterra, J., Yauch, R. L., Callahan, C. A., Fu, L., Holcomb, T., Stinson, J., Gould, S. E., Coleman, B., LoRusso, P. M., Von Hoff, D. D., de Sauvage, F. J., and Low, J. A. (2009). Treatment of medulloblastoma with hedgehog pathway inhibitor GDC-0449. *New England Journal of Medicine*, 361(12):1173–1178.

- Salic, A., Lee, E., Mayer, L., and Kirschner, M. W. (2000). Control of beta-catenin stability: reconstitution of the cytoplasmic steps of the wnt pathway in xenopus egg extracts. *Molecular Cell*, 5(3):523–532.
- Sang, H., Lu, Z., Li, Y., Ru, B., Wang, W., and Chen, J. (2001). Phosphorylation of tau by glycogen synthase kinase 3beta in intact mammalian cells influences the stability of microtubules. *Neuroscience Letters*, 312(3):141–144.
- Sansom, O. J., Griffiths, D. F. R., Reed, K. R., Winton, D. J., and Clarke, A. R. (2005). Apc deficiency predisposes to renal carcinoma in the mouse. *Oncogene*, 24(55):8205–8210.
- Sarkar, S., Krishna, G., Imarisio, S., Saiki, S., O’Kane, C. J., and Rubinsztein, D. C. (2008). A rational mechanism for combination treatment of Huntington’s disease using lithium and rapamycin. *Human Molecular Genetics*, 17(2):170–178.
- Sauer, B. and Henderson, N. (1988). Site-specific DNA recombination in mammalian cells by the Cre recombinase of bacteriophage P1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 85(14):5166–5170.
- Schüller, U., Heine, V. M., Mao, J., Kho, A. T., Dillon, A. K., Han, Y., Huillard, E., Sun, T., Ligon, A. H., Qian, Y., Ma, Q., Alvarez-Buylla, A., McMahon, A. P., Rowitch, D. H., and Ligon, K. L. (2008). Acquisition of granule neuron precursor identity is a critical determinant of progenitor cell competence to form shh-induced medulloblastoma. *Cancer Cell*, 14(2):123–34.
- Schüller, U., Zhao, Q., Godinho, S. A., Heine, V. M., Medema, R. H., Pellman, D., and Rowitch, D. H. (2007). Forkhead transcription factor FoxM1 regulates mitotic entry and prevents spindle defects in cerebellar granule neuron precursors. *Molecular and Cellular Biology*, 27(23):8259–70.
- Schwalbe, E. C., Lindsey, J. C., Straughton, D., Hogg, T. L., Cole, M., Megahed, H., Ryan, S. L., Lusher, M. E., Taylor, M. D., Gilbertson, R. J., Ellison, D. W., Bailey, S., and Clifford, S. C. (2011). Rapid diagnosis of medulloblastoma molecular subgroups. *Clinical Cancer Research*, 17(7):1883–1894.
- Senatorov, V. V., Ren, M., Kanai, H., Wei, H., and Chuang, D. (2004). Short-term lithium treatment promotes neuronal survival and proliferation in rat striatum infused with quinolinic acid, an excitotoxic model of Huntington’s disease. *Molecular Psychiatry*, 9(4):371–385.
- Sharpless, N. E. and Depinho, R. A. (2006). The mighty mouse: genetically engineered mouse models in cancer drug development. *Nature Reviews Drug Discovery*, 5(9):741–754.
- Shein, H. M. and Enders, J. F. (1962). Transformation induced by simian virus 40 in human renal cell cultures. i. morphology and growth characteristics. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 48:1164–1172.

- Slade, I., Murray, A., Hanks, S., Kumar, A., Walker, L., Hargrave, D., Douglas, J., Stiller, C., Izatt, L., and Rahman, N. (2011). Heterogeneity of familial medulloblastoma and contribution of germline PTCH1 and SUFU mutations to sporadic medulloblastoma. *Familial Cancer*, 10(2):337–342.
- Sternberg, N., Hamilton, D., and Hoess, R. (1981). Bacteriophage P1 site-specific recombination. II. recombination between loxP and the bacterial chromosome. *Journal of Molecular Biology*, 150(4):487–507.
- Stone, D. M., Hynes, M., Armanini, M., Swanson, T. A., Gu, Q., Johnson, R. L., Scott, M. P., Pennica, D., Goddard, A., Phillips, H., Noll, M., Hooper, J. E., de Sauvage, F., and Rosenthal, A. (1996). The tumour-suppressor gene patched encodes a candidate receptor for sonic hedgehog. *Nature*, 384(6605):129–134.
- Stoothoff, W. H. and Johnson, G. V. (2001). Hyperosmotic stress-induced apoptosis and tau phosphorylation in human neuroblastoma cells. *Journal of Neuroscience Research*, 65(6):573–582.
- Su, Y., Ryder, J., Li, B., Wu, X., Fox, N., Solenberg, P., Brune, K., Paul, S., Zhou, Y., Liu, F., and Ni, B. (2004). Lithium, a common drug for bipolar disorder treatment, regulates amyloid-beta precursor protein processing. *Biochemistry*, 43(22):6899–6908.
- Subramaniam, D., Ramalingam, S., Linehan, D. C., Dieckgraefe, B. K., Postier, R. G., Houchen, C. W., Jensen, R. A., and Anant, S. (2011). RNA binding protein CUGBP2/CELF2 mediates curcumin-induced mitotic catastrophe of pancreatic cancer cells. *PLoS One*, 6(2):e16958.
- Sun, H., Li, M., Lu, J., Yan, D., Zhou, C., Fan, J., Qin, X., Tang, H., and Peng, Z. (2011). Overexpression of forkhead box m1 protein associates with aggressive tumor features and poor prognosis of hepatocellular carcinoma. *Oncology Reports*, 25(6):1533–1539.
- Suresh, T. N., Santosh, V., Yasha, T. C., Anandh, B., Mohanty, A., Indiradevi, B., Sampath, S., and Shankar, S. K. (2004). Medulloblastoma with extensive nodularity: a variant occurring in the very young-clinicopathological and immunohistochemical study of four cases. *Child's Nervous System*, 20(1):55–60.
- Sutton, L. P., Honardoust, D., Mouyal, J., Rajakumar, N., and Rushlow, W. J. (2007). Activation of the canonical wnt pathway by the antipsychotics haloperidol and clozapine involves dishevelled-3. *Journal of Neurochemistry*, 102(1):153–169.
- Taillibert, S., Laigle-Donadey, F., and Sanson, M. (2004). Palliative care in patients with primary brain tumors. *Current Opinion in Oncology*, 16(6):587–592.
- Tait, D. M., Thornton-Jones, H., Bloom, H. J., Lemerle, J., and Morris-Jones, P. (1990). Adjuvant chemotherapy for medulloblastoma: the first multi-centre control trial of the international society of paediatric oncology (SIOP I). *European Journal of Cancer*, 26(4):464–469.

- Tan, Y., Raychaudhuri, P., and Costa, R. H. (2007). Chk2 mediates stabilization of the FoxM1 transcription factor to stimulate expression of DNA repair genes. *Molecular and Cellular Biology*, 27(3):1007–1016.
- Tan, Y., Yoshida, Y., Hughes, D. E., and Costa, R. H. (2006). Increased expression of hepatocyte nuclear factor 6 stimulates hepatocyte proliferation during mouse liver regeneration. *Gastroenterology*, 130(4):1283–1300.
- Tanaka, T., Ishii, T., Mizuno, D., Mori, T., Yamaji, R., Nakamura, Y., Kumazawa, S., Nakayama, T., and Akagawa, M. (2011). (-)-Epigallocatechin-3-gallate suppresses growth of AZ521 human gastric cancer cells by targeting the DEAD-box RNA helicase p68. *Free Radical Biology & Medicine*, 50(10):1324–1335.
- Tarbell, N. J., Loeffler, J. S., Silver, B., Lynch, E., Lavally, B. L., Kupsky, W. J., Scott, R. M., and Sallan, S. E. (1991). The change in patterns of relapse in medulloblastoma. *Cancer*, 68(7):1600–1604.
- Taylor, M. D., Liu, L., Raffel, C., Hui, C., Mainprize, T. G., Zhang, X., Agatep, R., Chiappa, S., Gao, L., Lowrance, A., Hao, A., Goldstein, A. M., Stavrou, T., Scherer, S. W., Dura, W. T., Wainwright, B., Squire, J. A., Rutka, J. T., and Hogg, D. (2002). Mutations in SUFU predispose to medulloblastoma. *Nature Genetics*, 31(3):306–310.
- Taylor, M. D., Mainprize, T. G., and Rutka, J. T. (2000). Molecular insight into medulloblastoma and central nervous system primitive neuroectodermal tumor biology from hereditary syndromes: a review. *Neurosurgery*, 47(4):888–901.
- Taylor, M. D., Northcott, P. A., Korshunov, A., Remke, M., Cho, Y., Clifford, S. C., Eberhart, C. G., Parsons, D. W., Rutkowski, S., Gajjar, A., Ellison, D. W., Lichter, P., Gilbertson, R. J., Pomeroy, S. L., Kool, M., and Pfister, S. M. (2012). Molecular subgroups of medulloblastoma: the current consensus. *Acta Neuropathologica*, 123(4):465–472.
- Taylor, R. E., Bailey, C. C., Robinson, K., Weston, C. L., Ellison, D., Ironside, J., Lucraft, H., Gilbertson, R., Tait, D. M., Walker, D. A., Pizer, B. L., Imeson, J., and Lashford, L. S. (2003). Results of a randomized study of preradiation chemotherapy versus radiotherapy alone for nonmetastatic medulloblastoma: The international society of paediatric Oncology/United kingdom children’s cancer study group PNET-3 study. *Journal of Clinical Oncology*, 21(8):1581–1591.
- Teh, M., Gemenetzidis, E., Patel, D., Tariq, R., Nadir, A., Bahta, A. W., Waseem, A., and Hutchison, I. L. (2012). FOXM1 induces a global methylation signature that mimics the cancer epigenome in head and neck squamous cell carcinoma. *PLoS One*, 7(3):e34329.
- Teh, M., Wong, S., Neill, G. W., Ghali, L. R., Philpott, M. P., and Quinn, A. G. (2002). FOXM1 is a downstream target of gli1 in basal cell carcinomas. *Cancer Research*, 62(16):4773–4780.

- Thompson, C. B. (1995). Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science*, 267(5203):1456–1462.
- Thompson, M. C., Fuller, C., Hogg, T. L., Dalton, J., Finkelstein, D., Lau, C. C., Chintagumpala, M., Adesina, A., Ashley, D. M., Kellie, S. J., Taylor, M. D., Curran, T., Gajjar, A., and Gilbertson, R. J. (2006). Genomics identifies medulloblastoma subgroups that are enriched for specific genetic alterations. *Journal of Clinical Oncology*, 24(12):1924–1931.
- Tolwinski, N. S. and Wieschaus, E. (2004). A nuclear function for armadillo/beta-catenin. *PLoS Biology*, 2(4):E95.
- Tremml, G., Dominguez, C., Rosti, V., Zhang, Z., Pandolfi, P. P., Keller, P., and Bessler, M. (1999). Increased sensitivity to complement and a decreased red blood cell life span in mice mosaic for a nonfunctional piga gene. *Blood*, 94(9):2945–2954.
- Tseng, A., Engel, F. B., and Keating, M. T. (2006). The GSK-3 inhibitor BIO promotes proliferation in mammalian cardiomyocytes. *Chemistry & Biology*, 13(9):957–963.
- Tsuji, S., Morinobu, S., Tanaka, K., Kawano, K., and Yamawaki, S. (2003). Lithium, but not valproate, induces the serine/threonine phosphatase activity of protein phosphatase 2A in the rat brain, without affecting its expression. *Journal of Neural Transmission*, 110(4):413–425.
- Ulloa, F., Itasaki, N., and Briscoe, J. (2007). Inhibitory gli3 activity negatively regulates wnt/beta-catenin signaling. *Current Biology*, 17(6):545–550.
- Vacheron-Trystram, M., Braitman, A., Cheref, S., and Auffray, L. (2004). Antipsychotics in bipolar disorders. *Encephale*, 30(5):417–424.
- Vakifahmetoglu, H., Olsson, M., and Zhivotovsky, B. (2008). Death through a tragedy: mitotic catastrophe. *Cell Death and Differentiation*, 15(7):1153–1162.
- Valtz, N. L., Hayes, T. E., Norregaard, T., Liu, S. M., and McKay, R. D. (1991). An embryonic origin for medulloblastoma. *New Biologist*, 3(4):364–371.
- van den Boom, J., Wolter, M., Kuick, R., Misek, D. E., Youkilis, A. S., Wechsler, D. S., Sommer, C., Reifemberger, G., and Hanash, S. M. (2003). Characterization of gene expression profiles associated with glioma progression using oligonucleotide-based microarray analysis and real-time reverse transcription-polymerase chain reaction. *American Journal of Pathology*, 163(3):1033–1043.
- von Hoff, K., Hartmann, W., von Bueren, A. O., Gerber, N. U., Grotzer, M. A., Pietsch, T., and Rutkowski, S. (2010). Large cell/anaplastic medulloblastoma: outcome according to myc status, histopathological, and clinical risk factors. *Pediatric Blood & Cancer*, 54(3):369–376.

- Walker, D. A. and Wilne, S. (2005). Treatment of medulloblastoma in young children. *Lancet Oncology*, 6(8):541–542.
- Wallace, V. A. (1999). Purkinje-cell-derived sonic hedgehog regulates granule neuron precursor cell proliferation in the developing mouse cerebellum. *Current Biology*, 9(8):445–448.
- Wang, I., Chen, Y., Hughes, D., Petrovic, V., Major, M. L., Park, H. J., Tan, Y., Ackerson, T., and Costa, R. H. (2005). Forkhead box m1 regulates the transcriptional network of genes essential for mitotic progression and genes encoding the SCF (Skp2-Cks1) ubiquitin ligase. *Molecular and Cellular Biology*, 25(24):10875–10894.
- Wang, I., Chen, Y., Hughes, D. E., Ackerson, T., Major, M. L., Kalinichenko, V. V., Costa, R. H., Raychaudhuri, P., Tyner, A. L., and Lau, L. F. (2008a). FoxM1 regulates transcription of JNK1 to promote the G1/S transition and tumor cell invasiveness. *Journal of Biological Chemistry*, 283(30):20770–8.
- Wang, I., Meliton, L., Ren, X., Zhang, Y., Balli, D., Snyder, J., Whitsett, J. A., Kalinichenko, V. V., and Kalin, T. V. (2009a). Deletion of forkhead box m1 transcription factor from respiratory epithelial cells inhibits pulmonary tumorigenesis. *PLoS One*, 4(8):e6609.
- Wang, I., Meliton, L., Tretiakova, M., Costa, R. H., Kalinichenko, V. V., and Kalin, T. V. (2008b). Transgenic expression of the forkhead box m1 transcription factor induces formation of lung tumors. *Oncogene*, 27(30):4137–4149.
- Wang, X., Kiyokawa, H., Dennewitz, M. B., and Costa, R. H. (2002). The forkhead box m1b transcription factor is essential for hepatocyte DNA replication and mitosis during mouse liver regeneration. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(26):16881–16886.
- Wang, Y., Zhou, Z., Walsh, C. T., and McMahon, A. P. (2009b). Selective translocation of intracellular smoothened to the primary cilium in response to hedgehog pathway modulation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(8):2623–2628.
- Wang, Z., Banerjee, S., Kong, D., Li, Y., and Sarkar, F. H. (2007). Down-regulation of forkhead box m1 transcription factor leads to the inhibition of invasion and angiogenesis of pancreatic cancer cells. *Cancer Research*, 67(17):8293–8300.
- Wechsler-Reya, R. J. and Scott, M. P. (1999). Control of neuronal precursor proliferation in the cerebellum by sonic hedgehog. *Neuron*, 22(1):103–114.
- Wedding, U., Meran, J., and Höffken, K. (2008). Übertherapie in der Onkologie: Wann ist weniger mehr? *Der Onkologe*, 14(7):691–700.

- Weigel, D., Jürgens, G., Küttner, F., Seifert, E., and Jäckle, H. (1989). The homeotic gene fork head encodes a nuclear protein and is expressed in the terminal regions of the drosophila embryo. *Cell*, 57(4):645–658.
- Weiner, M. L., Batt, K. J., Putman, D. L., Curren, R. D., and Yang, L. L. (1990). Genotoxicity evaluation of lithium hypochlorite. *Toxicology*, 65(1-2):1–22.
- Weiss, E. and Hess, C. F. (1999). [HIT'91: precision and acute maximal side effects of radiotherapy of craniospinal axis. concerning the contribution by R.D. Kortmann et al., strahlenther onkol 1999;175:162-9 (No.4)]. *Strahlentherapie und Onkologie: Organ der Deutschen Röntgengesellschaft*, 175(5):245–246.
- Westendorf, J. M., Rao, P. N., and Gerace, L. (1994). Cloning of cDNAs for M-phase phosphoproteins recognized by the MPM2 monoclonal antibody and determination of the phosphorylated epitope. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91(2):714–718.
- Wetmore, C., Eberhart, D. E., and Curran, T. (2001). Loss of p53 but not ARF accelerates medulloblastoma in mice heterozygous for patched. *Cancer Research*, 61(2):513–516.
- Whitfield, M. L., George, L. K., Grant, G. D., and Perou, C. M. (2006). Common markers of proliferation. *Nature Reviews Cancer*, 6(2):99–106.
- Whitfield, M. L., Sherlock, G., Saldanha, A. J., Murray, J. I., Ball, C. A., Alexander, K. E., Matese, J. C., Perou, C. M., Hurt, M. M., Brown, P. O., and Botstein, D. (2002). Identification of genes periodically expressed in the human cell cycle and their expression in tumors. *Molecular Biology of the Cell*, 13(6):1977–2000.
- Wielenga, V. J., Smits, R., Korinek, V., Smit, L., Kielman, M., Fodde, R., Clevers, H., and Pals, S. T. (1999). Expression of CD44 in apc and tcf mutant mice implies regulation by the WNT pathway. *American Journal of Pathology*, 154(2):515–523.
- Wierstra, I. and Alves, J. (2006). FOXM1c transactivates the human c-myc promoter directly via the two TATA boxes p1 and p2. *FEBS*, 273(20):4645–4667.
- Wierstra, I. and Alves, J. (2007a). The central domain of transcription factor FOXM1c directly interacts with itself in vivo and switches from an essential to an inhibitory domain depending on the FOXM1c binding site. *Biological Chemistry*, 388(8):805–818.
- Wierstra, I. and Alves, J. (2007b). FOXM1, a typical proliferation-associated transcription factor. *Biological Chemistry*, 388(12):1257–1274.
- Wierstra, I. and Alves, J. (2007c). FOXM1c and sp1 transactivate the p1 and p2 promoters of human c-myc synergistically. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 352(1):61–68.

- Wijgerde, M., McMahon, J. A., Rule, M., and McMahon, A. P. (2002). A direct requirement for hedgehog signaling for normal specification of all ventral progenitor domains in the presumptive mammalian spinal cord. *Genes & Development*, 16(22):2849–2864.
- Wolf, F., Wandke, C., Isenberg, N., and Geley, S. (2006). Dose-dependent effects of stable cyclin b1 on progression through mitosis in human cells. *EMBO Journal*, 25(12):2802–2813.
- Xia, J., Wang, H., Liang, L., Peng, B., Wu, Z., Chen, L., Xue, L., Li, Z., and Li, W. (2012). Overexpression of FOXM1 is associated with poor prognosis and clinicopathologic stage of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Pancreas*, 4(41):629–35.
- Xie, J., Murone, M., Luoh, S. M., Ryan, A., Gu, Q., Zhang, C., Bonifas, J. M., Lam, C. W., Hynes, M., Goddard, A., Rosenthal, A., Epstein, E H, J., and de Sauvage, F. J. (1998). Activating smoothened mutations in sporadic basal-cell carcinoma. *Nature*, 391(6662):90–92.
- Xu, J., Erdreich-Epstein, A., Gonzalez-Gomez, I., Melendez, E. Y., Smbatyan, G., Moats, R. A., Rosol, M., Biegel, J. A., and Reynolds, C. P. (2012). Novel cell lines established from pediatric brain tumors. *Journal of Neurooncology*, 107(2):269–80.
- Yamagata, K., Daitoku, H., Takahashi, Y., Namiki, K., Hisatake, K., Kako, K., Mukai, H., Kasuya, Y., and Fukamizu, A. (2008). Arginine methylation of FOXO transcription factors inhibits their phosphorylation by akt. *Molecular Cell*, 32(2):221–231.
- Yan, D., Wiesmann, M., Rohan, M., Chan, V., Jefferson, A. B., Guo, L., Sakamoto, D., Caothien, R. H., Fuller, J. H., Reinhard, C., Garcia, P. D., Randazzo, F. M., Escobedo, J., Fantl, W. J., and Williams, L. T. (2001). Elevated expression of axin2 and hnk4 mRNA provides evidence that wnt/beta -catenin signaling is activated in human colon tumors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(26):14973–14978.
- Yang, D. K., Son, C. H., Lee, S. K., Choi, P. J., Lee, K. E., and Roh, M. S. (2009). Forkhead box m1 expression in pulmonary squamous cell carcinoma: correlation with clinicopathologic features and its prognostic significance. *Human Pathology*, 40(4):464–470.
- Yang, Z., Ellis, T., Markant, S. L., Read, T., Kessler, J. D., Bourboulas, M., Schüller, U., Machold, R., Fishell, G., Rowitch, D. H., Wainwright, B. J., and Wechsler-Reya, R. J. (2008). Medulloblastoma can be initiated by deletion of patched in lineage-restricted progenitors or stem cells. *Cancer Cell*, 14(2):135–45.
- Yao, K. M., Sha, M., Lu, Z., and Wong, G. G. (1997). Molecular analysis of a novel winged helix protein, WIN. Expression pattern, DNA binding property, and alternative splicing within the DNA binding domain. *Journal of Biological Chemistry*, 272(32):19827–19836.

- Yauch, R. L., Dijkgraaf, G. J. P., Alicke, B., Januario, T., Ahn, C. P., Holcomb, T., Pujara, K., Stinson, J., Callahan, C. A., Tang, T., Bazan, J. F., Kan, Z., Seshagiri, S., Hann, C. L., Gould, S. E., Low, J. A., Rudin, C. M., Sauvage, D., and J, F. (2009). Smoothened mutation confers resistance to a hedgehog pathway inhibitor in medulloblastoma. *Science*, 326(5952):572–574.
- Ye, H., Holterman, A. X., Yoo, K. W., Franks, R. R., and Costa, R. H. (1999). Premature expression of the winged helix transcription factor HFH-11B in regenerating mouse liver accelerates hepatocyte entry into S phase. *Molecular and Cellular Biology*, 19(12):8570–8580.
- Ye, H., Kelly, T. F., Samadani, U., Lim, L., Rubio, S., Overdier, D. G., Roebuck, K. A., and Costa, R. H. (1997). Hepatocyte nuclear factor 3/fork head homolog 11 is expressed in proliferating epithelial and mesenchymal cells of embryonic and adult tissues. *Molecular and Cellular Biology*, 17(3):1626–1641.
- Yoshida, Y., Wang, I., Yoder, H. M., Davidson, N. O., and Costa, R. H. (2007). The forkhead box m1 transcription factor contributes to the development and growth of mouse colorectal cancer. *Gastroenterology*, 132(4):1420–1431.
- Yu, J., Deshmukh, H., Payton, J. E., Dunham, C., Scheithauer, B. W., Tihan, T., Prayson, R. A., Guha, A., Bridge, J. A., Ferner, R. E., Lindberg, G. M., Gutmann, R. J., Emmett, R. J., Salavaggione, L., Gutmann, D. H., Nagarajan, R., Watson, M. A., and Perry, A. (2011). Array-based comparative genomic hybridization identifies CDK4 and FOXM1 alterations as independent predictors of survival in malignant peripheral nerve sheath tumor. *Clinical Cancer Research*, 17(7):1924–1934.
- Yuan, B., Latek, R., Hossbach, M., Tuschl, T., and Lewitter, F. (2004). siRNA selection server: an automated siRNA oligonucleotide prediction server. *Nucleic Acids Research*, 32:W130–W134.
- Zeltzer, P. M., Boyett, J. M., Finlay, J. L., Albright, A. L., Rorke, L. B., Milstein, J. M., Allen, J. C., Stevens, K. R., Stanley, P., Li, H., Wisoff, J. H., Geyer, J. R., McGuire-Cullen, P., Stehbens, J. A., Shurin, S. B., and Packer, R. J. (1999). Metastasis stage, adjuvant treatment, and residual tumor are prognostic factors for medulloblastoma in children: conclusions from the children’s cancer group 921 randomized phase III study. *Journal of Clinical Oncology*, 17(3):832–845.
- Zhang, N., Wei, P., Gong, A., Chiu, W., Lee, H., Colman, H., Huang, H., Xue, J., Liu, M., Wang, Y., Sawaya, R., Xie, K., Yung, W. K. A., Medema, R. H., He, X., and Huang, S. (2011). FoxM1 promotes beta-catenin nuclear localization and controls wnt target-gene expression and glioma tumorigenesis. *Cancer Cell*, 20(4):427–442.
- Zhao, Y., Gao, X., Zhao, Y. D., Mirza, M. K., Frey, R. S., Kalinichenko, V. V., Wang, I., Costa, R. H., and Malik, A. B. (2006). Endothelial cell-restricted disruption of FoxM1

impairs endothelial repair following LPS-induced vascular injury. *Journal of Clinical Investigation*, 116(9):2333–2343.

Danksagung

Einen großen Dank möchte ich zuerst Herrn Professor Dr. med. Dr. h. c. Hans Kretzschmar aussprechen. Einerseits war die Übernahme der Gutachtertätigkeit für Sie überhaupt kein Problem und andererseits möchte ich mich einfach für drei sehr schöne und vorallen lehrreiche Jahre am ZNP bedanken!

Der nächste Dank gebührt Ulrich, bei dem ich einen sehr tiefen Einblick in die Neuropathologie und die Pathologie des Medulloblastoms genießen durfte und wobei ich sehr viel Neues und Interessantes gelernt habe. Dem gesamten harten Kern der Arbeitsgruppe „Schüller“ - Julia, Daniel, Julia, Silvia - vielen Dank für die gemeinsame Zeit, es war einfach schön und hat viel Spaß gemacht! Natürlich auch an dieser Stelle danke an alle Ehemaligen und den medizinischen Doktoranden, Tanja, Alex, Markus und Vroni.

Ich möchte auch dem Tierstall am ZNP danke sagen. Die drei Jahre waren ohne große Probleme schnell vorbei, stellvertretend dafür danke, Mehdi.

Die anderen Mitstreiter im S2-Labor werden natürlich auch nicht vergessen: Janina und die AG „Schmidt“: Felix, Martin, Catha und Karin. Ich habe die drei Jahre im zweiten Stock wirklich genossen und dafür möchte ich danke sagen.

Außerdem ein großer Dank an die anderen Mitstreiter am ZNP, die auch dafür gesorgt haben, dass nicht nur gearbeitet wurde, sondern auch andere Aktivitäten wie Grillen und Sport einen großen Stellenwert hatten.

Der letzte Dank gebührt natürlich Silvi, die mich während der Zeit immer unterstützt hat!

Veröffentlichte Teile der Arbeit

Publikation

Priller M., Pöschl J., Abrão L., von Bueren AO., Cho YJ., Rutkowski S., Kretzschmar HA., Schüller U. (2011). Expression of FoxM1 is required for the proliferation of medulloblastoma cells and indicates worse survival of patients. *Clinical Cancer Research* 17(21):6791-801

Poster

PhD Symposion <interact 2010> am 23. März 2010, München

Markus Priller, Leticia Abrão, Julia Pöschl, Hans A. Kretzschmar and Ulrich Schüller
Expression of Forkhead box M1 (FOX M1) is required for the proliferation of medulloblastoma cells and indicates worse survival of patients.

XVIII. Wilsede Meeting, Modern Trends In Human Leukemia & Cancer; 19.-23. Juni 2010, Wilsede

Markus Priller, Leticia Abrão, Julia Pöschl, Hans A. Kretzschmar and Ulrich Schüller
Expression of FOXM1 is required for the proliferation of medulloblastoma cells and indicates worse survival of patients.

56. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Neuropathologie und Neuroanatomie; 21.-24. September 2011, Tübingen

Markus Priller, Leticia Abrão, Julia Pöschl, Hans A. Kretzschmar and Ulrich Schüller
Expression of FOXM1 is required for the proliferation of medulloblastoma cells and indicates worse survival of patients.

Lebenslauf

Name	Markus Priller
Geburtsdatum	05.04.1983
Geburtsort	Ingolstadt
Familienstand	ledig

Schulbildung

09/1989 - 08/1993	Grundschule „An der Münchener Straße“, Ingolstadt
09/1993 - 06/2002	Apian-Gymnasium, Ingolstadt (Abschluss: Abitur)

Wehrdienst

07/2002 - 07/2003	Grundwehrdienst bei sPiLehrBtl 230, Ingolstadt
-------------------	--

Studium

10/2003 - 12/2008	Biologie, Universität Regensburg
12/2007 - 12/2008	Diplomarbeit

Promotion

01/2009 - 12/2011	Zentrum für Neuropathologie und Prionforschung, Ludwig-Maximilians-Universität München; Betreuer: Prof. Dr. med. Dr. h. c. Hans Kretzschmar, FRCPATH
-------------------	--

PostDoc

seit 03/2012	Research Unit for Protein Science, Helmholtz Center Munich, German Research Center for Environmental Health
--------------	---

Publikationsliste

Heine VM., **Priller M.**, Ling J., Rowitch DH., Schüller U. (2010). Dexamethasone destabilizes Nmyc to inhibit the growth of hedgehog-associated medulloblastoma. *Cancer Research* 70(13):5220-5

Priller M., Pöschl J., Abrão L., von Bueren AO., Cho YJ., Rutkowski S., Kretzschmar HA., Schüller U. (2011). Expression of FoxM1 is required for the proliferation of medulloblastoma cells and indicates worse survival of patients. *Clinical Cancer Research* 17(21):6791-801

Frick A., Grammel D., Schmidt F., Pöschl J., **Priller M.**, Pagella P., von Bueren AO., Peraud A., Tonn JC., Herms J., Rutkowski S., Kretzschmar HA., Schüller U. (2012). Proper cerebellar development requires expression of β -integrin in Bergmann glia, but not in granule neurons. *Glia*, 60(5):820-32

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig verfasst und mich keiner anderen als den hier angegebenen Hilfsmitteln bedient habe. Alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen wurden, sind als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen. Ich erkläre, dass die hier vorliegende Dissertation nicht in gleicher oder ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

München, den 23. September 2013